

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina SMODEJ

**POSTOPEK UGOTAVLJANJA ESTROGENSKE
AKTIVNOSTI ODPADNIH VOD**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina SMODEJ

**POSTOPEK UGOTAVLJANJA ESTROGENSKE AKTIVNOSTI
ODPADNIH VOD**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**A METHOD FOR DETERMINATION OF ESTROGENIC ACTIVITY
OF WASTEWATERS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti. Vse analize so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 13. 5. 2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorico doc. dr. Tatjano Tišler in za recenzenta prof. dr. Toma Turk.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentorica: doc. dr. Tatjana Tišler

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Tatjana TIŠLER
Kemijski inštitut Ljubljana, Oddelek za okoljske vede in inženirstvo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tina Smodej

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 628.31+628.35:577.175.6:582.282.23(043)=163.6
- KG ekotoksikologija/varstvo okolja/biološki testi/YES test/biološke čistilne naprave/odpadne vode/hormoni/estrogen/estrogenska aktivnost/kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/Slovenija
- AV SMODEJ, Tina
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/TIŠLER, Tatjana (somentorica)/TURK, Tom (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2012
- IN POSTOPEK UGOTAVLJANJA ESTROGENSKE AKTIVNOSTI ODPADNIH VOD
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 59 str., 6 pregl., 14 sl., 62 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI Vodno okolje je še posebej dovzetno za onesnaženje, saj v reke, jezera in morje preko čistilnih naprav in industrije namerno izpuščamo odpadne vode. Pomembna skupina onesnaževal so hormonski motilci z estrogenim delovanjem, nekateri med njimi so biološko aktivni že pri zelo nizkih koncentracijah (ng/L). Zato je pomembno, da lahko z analitskimi postopki dokazujemo njihovo prisotnost v vodah. V diplomski nalogi smo uvedli metodologijo za ugotavljanje prisotnosti hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem v vzorcih vtokov in iztokov različnih čistilnih naprav. Vzorce smo najprej koncentrirali s postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE). V koncentriranih vzorcih smo ugotavljali estrogensko aktivnost z biološkim testom YES, kjer smo uporabili gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Prisotnost strupenih snovi v odpadnih vodah je povzročila zmanjšano rast kvasovk in posledično onemogočala določanje estrogenske aktivnosti vzorcev. Zato smo z dodatnim čiščenjem vzorcev na kolonah, polnjenih s silikagelom odstranili strupene snovi, ki zavirajo rast kvasovk. Da bi ugotovili celokupno estrogensko aktivnost, smo poleg dodatnega čiščenja izvedli dekonjugacijo z encimom β -glukuronidaza in nato preverili estrogensko aktivnost z YES testom. Glede na dobljene rezultate smo ugotovili, da sta postopka čiščenja s silikagelom in/ali dekonjugacije pripomogla k zaznavanju dejanske estrogenske aktivnosti z YES testom v večini testiranih vzorcev odpadnih vod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 628.31+628.35:577.175.6:582.282.23(043)=163.6
- CX ecotoxicology/environmental protection/biological tests/test YES/biological wastewater treatment plants/wastewaters/hormones/estrogen/estrogenic activity/yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/Slovenia
- AU SMODEJ, Tina
- AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/TIŠLER, Tatjana (co-advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2012
- TI A METHOD FOR DETERMINATION OF ESTROGENIC ACTIVITY OF WASTEWATERS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO IX, 59 p., 6 tab., 14 fig., 62 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Wastewaters from wastewater treatment plants (WWTPs) and industry are released in rivers, lakes and sea, which makes the aquatic environment particularly susceptible to pollution. Endocrine disrupting compounds (EDCs) with estrogenic activity is an important group of pollutants and some of them could elicit biological effects at very low concentrations (ng/L). Therefore, it is important to detect these compounds in waters using appropriate methodology, which was introduced in this work. The presence of endocrine disrupting compounds with estrogenic activity in the inflow and outflow samples of different WWTPs was examined. Samples were initially concentrated using solid phase extraction (SPE) procedure and then estrogenic activity of concentrated samples was determined by YES bioassay, where the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used. The presence of toxic compounds in tested samples inhibited the growth of yeast and consequently measurements of estrogenic activity in samples were not possible. For this reason, samples were additionally cleaned on columns based on silica gel to remove toxic substances. Deconjugation with enzyme β -glucuronidase was performed in order to determine total estrogenic activity of samples and then tested for estrogenic activity by YES assay. From the obtained results we conclude that treatment with silica gel and/or deconjugation contributed to the detection of total estrogenic activity with YES assay in almost all tested samples from WWTPs.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DELOVANJE ESTROGENOV IN NJIHOVA PRISOTNOST V OKOLJU	5
2.2 MIKROORGANIZMI, SPOSOBNI RAZGRADNJE ESTROGENOV	8
2.3 USODA ESTROGENOV V ČISTILNIH NAPRAVAH	9
2.3.1 Odstranjevanje hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem na bioloških čistilnih napravah	10
2.3.2 Druge metode odstranjevanja estrogenov	13
2.4 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV	14
2.4.1 Predpriprava vzorcev - koncentriranje	14
2.4.2 Predpriprava vzorcev – dodatno čiščenje	15
2.4.3 Biološke metode (biotesti)	16
2.4.3.1 YES (Yeast Estrogen Screen) test	17
2.4.4 Kemijske metode	19
2.5 IZGUBE ESTROGENOV MED ANALIZO	19
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 VZORCI	20
3.1.1 Predčiščenje vzorcev	20
3.2 POSTOPEK KONCENTRIRANJA	20
3.3 DODATNO ČIŠČENJE VZORCEV	21
3.4 POSTOPEK DEKONJUGACIJE	22
3.5 TEST YES	23
3.5.1 Kvasovka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.5.1.1 Priprava minimalnega gojišča (pH = 7,1)	23

3.5.1.2	Priprava rastnega gojišča	24
3.5.1.2.1	Raztopina glukoze	24
3.5.1.2.2	Raztopina asparaginske kisline	24
3.5.1.2.3	Priprava raztopine vitaminov	24
3.5.1.2.4	Raztopina treonina	24
3.5.1.2.5	Bakrov (II) sulfat	25
3.5.1.3	Priprava trdnega rastnega gojišča	25
3.5.1.4	Priprava tekoče kulture kvasovk	25
3.5.2	Nanos vzorca na mikrotitrsko ploščo	26
3.5.3	Izračun (relativne) estrogenske aktivnosti vzorcev	28
3.5.4	Izračun zaviranja rasti kvasovk	29
3.6	LIZA KVASNIH CELIC	29
4	REZULTATI	31
4.1	ZAVIRANJE RASTI KVASOVK	31
4.2	RELATIVNA ESTROGENSKA AKTIVNOST (REA)	34
4.2.1	Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave A	35
4.2.2	Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave B	37
4.2.3	Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave C	38
4.2.4	Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave D	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE A	42
5.2	ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE B	45
5.3	ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE C	45
5.4	ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE D	46
5.5	SKLEPI	48
6	POVZETEK	51
7	VIRI	53
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti estrogenov (Liu in sod., 2009).....	4
Preglednica 2: Učinkovitost odstranjevanja in končne koncentracije v iztokih za različne estrogene (Des Mes in sod., 2008).....	12
Preglednica 3: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (A1) in iztoka (A2) čistilne naprave A	32
Preglednica 4: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (B1) in iztoka (B2) čistilne naprave B	33
Preglednica 5: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (C1) in iztoka (C2) čistilne naprave C	33
Preglednica 6: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (D1) in iztoka (D2) čistilne naprave D	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer fitoestrogena genistein (De Boever in sod., 2001)	4
Slika 2: Pretvorba mestranola v EE2 (Ternes in sod., 1999).....	6
Slika 3: Pretvorbe estrogenov (Allner in sod., 1997)	11
Slika 4: Prikaz neobdelanega silikatnega delca (Wells, 2003)	16
Slika 5: Shematski prikaz ekspresijskega sistema v gensko spremenjeni kvasovki <i>Saccharomyces cereviseae</i> in aktivacije sistema z estrogenom (Routledge in Sumpter, 1996).	18
Slika 6: Shema eksperimenta (glavni postopki)	27
Slika 7: Prikaz načina izračuna estrogenske aktivnosti	29
Slika 8: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave A – vtok, s standardno deviacijo	35
Slika 9: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave A – iztok, s standardno deviacijo	36
Slika 10: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave B – vtok in iztok, s standardno deviacijo	37
Slika 11: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave C – vtok, s standardno deviacijo	38
Slika 12: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave C – iztok, s standardno deviacijo	39
Slika 13: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave D – vtok, s standardno deviacijo	40
Slika 14: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave D – iztok, s standardno deviacijo	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

α -, β - ali γ -PB	α -, β - ali γ -proteobakterije
AP	alkilfenol
APEC	alkilfenol karboksilati
APnEO	alkilfenolni polietoksilati
BČN	biološka čistilna naprava
BPA	bisfenol A
CPN	ogljik, fosfor, dušik
ČN	čistilna naprava
DK	dekonjugacija
E1	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EA	estrogenska aktivnost
EE2	17 α -etinilestradiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (imunološka metoda, ki temelji na reakcijah antigenov s protitelesi)
ER	estrogenski receptor
E-S, E-G	estrogen sulfat, estrogen glukuronat
GAC	granulated activated carbon (aktivno oglje v granulah)
HME	hormonski motilci z estrogenim delovanjem
NP	nonilfenol
NPEO	neionski nonilfenol polietoksilati
OP	oktilfenol
<i>o,p'</i> -DDT	dikloro difenil trikloroetan
PAC	powdered activated carbon (aktivno oglje v prahu)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki
PCB	poliklorirani bifenoli
pKa	ionizacijska konstanta
REA	relativna estrogenska aktivnost
RIA	Radio Immuno Assay (imunološka metoda, ki temelji na reakcijah antigenov s protitelesi, označenimi z radioaktivnim označevalcem)
SBP	Steroid-Binding Proteins (steroid-vezavni proteini)
SG	silikagel
SPE	Solid Phase Extraction (ekstrakcija na trdni fazi)
Vtg	vitelogenin
YES	Yeast Estrogen Screen Assay (biološki test za ugotavljanje estrogenske aktivnosti s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

1 UVOD

Prva poročila o učinku hormonskih motilcev v okolju na vodne organizme so objavili leta 1980, ko so Howell in sod. v populaciji rib pojav nenormalnega izražanja sekundarnih spolnih znakov povezali z onesnaženjem okolja. Kasneje se je izkazalo, da hormonski motilci vplivajo tudi na endokrini sistem ptic, plazilcev in sesalcev, vključno s človekom.

Večina estrogenov pride v okolje iz antropogenih virov, predvsem s komunalnimi odpadnimi vodami in odpadnimi vodami objektov intenzivne reje domačih živali. Glavni vir teh spojin v odpadnih vodah je urin, ki vsebuje 67 - 80 % dnevno izločenih estrogenov (Maurer in sod., 2006). Estrogeni so globalno razširjeni in jih lahko pričakujemo povsod tam, kjer je človek.

Svetovna Zdravstvena Organizacija (WHO/PCS/EDC/02.2, 2002) je tako izvedla raziskavo o hormonskih motilcih z endokrinim delovanjem na globalni ravni. Med hormonske motilce z estrogenim delovanjem (HME) prišteva spojine, ki jih proizvaja človek (pesticidi, alkilfenoli, poliklorirane spojine, plastifikatorji, itd.), rastline (fitoestrogeni) in glive (mikoestrogeni). V nasprotju s seznamom Evropske unije (Decision No 2455/2001/EC..., 2001) o prednostnih spojinah, ki onesnažujejo površinske vode, WHO vseeno ocenjuje, da so naravni estrogeni, kot so estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), estron (E1) in sintetični hormon 17 α -etinilestradiol (EE2), pomembna onesnaževala površinskih vod.

Različne biološke čistilne naprave ne odstranjujejo hormonskih motilcev enako učinkovito, zato je izredno pomemben monitoring odpadnih vod in okolja, kamor jih izpuščamo. V ta namen so razvili številne teste, s katerimi določamo estrogensko aktivnost vod. Večina raziskovalcev za dokazovanje prisotnosti HME uporablja biološke teste, za določanje posameznih spojin pa kemijske metode.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V diplomski nalogi je Katarina Levart (2009) ugotovila, da strupene snovi, prisotne v odpadni vodi, zavirajo rast kvasovk in tako onemogočajo določanje estrogenske aktivnosti (EA) s testom YES. Namen našega dela je uvesti metodologijo, ki vključuje postopek za odstranjevanje strupenih snovi v vzorcih odpadnih vod in tako omogočiti relevantno merjenje EA. Postopek, za katerega smo se odločili, je dodatno čiščenje na kolonah polnjenih s silikagelom (v nadaljevanju 'dodatno čiščenje').

Naravni estrogene v odpadnih vodah so ponavadi v konjugirani, neaktivni obliki in se tekom biološkega čiščenja lahko pretvorijo z dekonjugacijo v aktivno obliko. V diplomski nalogi bomo zato (kseno)estrogene v vzorcih odpadnih vod dekonjugirali z uporabo encima β -glukuronidaza, kar nam bo omogočilo zaznavo celokupne estrogenske aktivnosti v vzorcih.

Estrogensko aktivnost v neobdelanih in različno obdelanih vzorcih bomo določali z biološkim testom YES z gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*.

Metodologijo bomo preizkusili na vtokih in iztokih 4 različnih bioloških čistilnih naprav (BČN; postopek z aktivnim blatom).

V diplomski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

- Na vtokih BČN zaznamo večjo estrogensko aktivnost kot na iztokih BČN.
- Prisotnost številnih strupenih snovi v vtokih in iztokih lahko zavira rast kvasovk, kar otežuje ali onemogoči določanje estrogenske aktivnosti.
- Po odstranitvi strupenih snovi pričakujemo normalno rast kvasovk, kar omogoči ustrezno določanje dejanske estrogenske aktivnosti vzorcev.
- Po postopku dekonjugacije lahko določimo celokupno estrogensko aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

USEPA (The US Environmental Protection Agency) je leta 1997 hormonske motilce definirala kot eksogene snovi, ki ovirajo sintezo, izločanje, transport, vezavo, delovanje ali odstranitev naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za ohranjanje homeostaze, reprodukcijo, razvoj in/ali obnašanje.

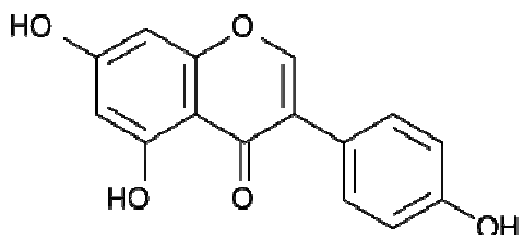
Hormonske motilce z estrogenim delovanjem razvrstimo v 4 glavne skupine:

- a) Naravni steroidni estrogeni (npr. estron [E1], 17 β -estradiol [E2] in estriol [E3])
- b) Sintetični estrogeni (npr. 17 α -etinilestradiol [EE2], mestranol, dietilstilbestrol)
- c) Fitoestrogeni in mikoestrogeni (npr. kumestrol, zerolenon, genistein)
- d) Ksenoestrogeni (npr. 4-*tert*-oktilfenol [4-*t*-OP], 4-nonilfenol [4-NP], nonilfenol etoksilat in nonilfenol dietoksilat [NPEO1, NPEO2], bisfenol A [BPA])

Naravni steroidni estrogeni so signalne molekule v endokrinem sistemu. Topni so v maščobah (hidrofobne narave) in relativno slabo hlapni. Sintetizirajo jih vsi vretenčarji in tudi nekatere žuželke iz holesterola. Vsi steroidni hormoni difundirajo skozi plazemsko membrano in se vežejo na znotrajcelične receptorje.

Sintetični estrogeni se uporabljajo kot kontracepcijska sredstva, za uravnavanje menstrualnega cikla pri ženskah, kot estrogen-nadomestna terapija pri ženskah v menopavzi in hormonska terapija pri transseksualnih ženskah. Proizvajajo jih farmacevtska podjetja.

Fitoestrogeni so naravne spojine, ki jih proizvajajo rastline in glive (mikoestrogeni). Kemijsko so sorodni steroidnim hormonom. Mednje spadajo izoflavoni, lignani (enterolakton) in koumestani. Izoflavona genistein, daidzein in njuna prekurzorja so v velikih količinah prisotni v semenih soje. Genistein se uporablja v medicini za zdravljenje raznih bolezni (Ibarreta in sod., 2001). Plesen *Fusarium* spp. proizvaja mikoestrogen zeralenon, ki ga lahko najdemo v živilih, kot so žitni kosmiči in žita, soja in koruza (Fink-Gremmels in Malekinejad, 2007).



Slika 1: Primer fitoestrogena genistein (De Boever in sod., 2001)

Ksenoestrogeni so različne industrijske in farmacevtske kemikalije, ki imajo ponavadi šibko estrogensko aktivnost, vendar so lahko prisotne v visokih koncentracijah. Sem spadajo razni pesticidi (*o,p'*-DDT, metoksiklor); policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in dioksini, ki nastajajo pri nepopolnem izgorevanju, dioksini pa so prisotni tudi v plastiki, smolah in belilih; poliklorirani bifenili (PCB) in njihovi hidroksilirani metaboliti, bisfenoli in ftalati, ki jih uporabljamo v industriji kot plastifikatorje, maziva in hladilne tekočine; alkilfenolni polietoksilati (APnEO) se uporabljajo v industriji kot površinsko aktivne snovi (npr. v detergentih), ponavadi so njihovi razgradni produkti, predvsem nonilfenoli (NP) in oktilfenoli (OP), bolj estrogensko aktivni od matične spojine. (Falconer in sod., 2006).

Bisfenol A je prisoten v epoksi smolah, ki jih uporabljajo kot prevleko na notranji strani skoraj vseh pločevink za hrano in pijačo, ter kot prevleko na zunanji površini rezervoarjev za vodo in vinskih sodih. Najdemo ga tudi v izdelkih iz polikarbonatne plastike, kot so plastenke za vodo, stekleničke za dojenčke, medicinski in zobotehničnih pripomočkov - npr. zobna polnila (Bolčič Tavčar in Perharič, 2010).

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti estrogenov (Liu in sod., 2009)

Spojina	Molekulska masa (g/mol)	Topnost v vodi (mg/l)	pK _a
Estron (E1)	270,4	30	10,5
17β-Estradiol (E2)	272,4	3,6	10,71
Estriol (E3)	288,4	441	10,4
17α-etinilestradiol (EE2)	296,4	11	10,4
Bisfenol A (BPA)	228,9	120	9,6

2.1 DELOVANJE ESTROGENOV IN NJIHOVA PRISOTNOST V OKOLJU

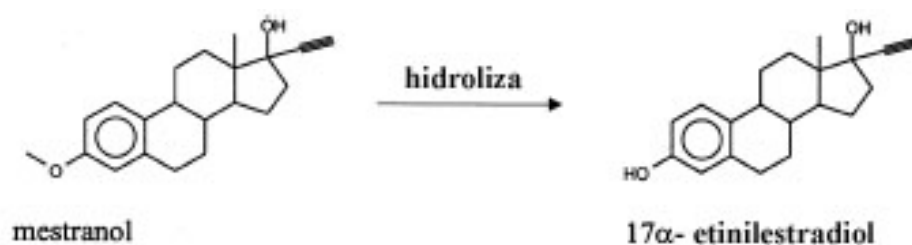
Hormonski motilci lahko delujejo na več načinov, in sicer kot:

- agonisti – spojina se veže na receptor na enak način kakor naravni hormon in aktivira receptor (večina ksenoestrogenov, ki ima podobno strukturo kot estrogeni, EE2);
- antagonisti – spojina, ki s svojo vezavo na receptor zavira ali zmanjša odzive receptorja in s tem tudi naravnega hormona; zaviranje receptorja je lahko kompetitivno (naravni hormon in antagonist tekmujeta za isto vezavno mesto) ali nekompetitivno (antagonist se ne veže na aktivno vezavno mesto, ampak v bližini); take spojine so nekateri herbicidi;
- spojine, ki vplivajo posredno, tako da zavirajo encime, ki sodelujejo pri sintezi, razgradnji ali biokemijskih pretvorbah naravnih hormonov; npr. fitoestrogen enterolakton zavira aromatazo, ki katalizira pretvorbo testosterona v E2 (Makela in sod., 2000). Določeni izoflavoni in hidroksilirani PCB zavirajo sulfotransferaze, ki sodelujejo pri inaktivaciji estrogenov (Kester in sod., 2000).

Hormonski motilci z estrogenim delovanjem lahko delujejo tudi anti-androgeno, saj se prisotnost estradiola v centralnem živčnem sistemu prevede kot signal za presežek testosterona, zaradi česar se vključi povratna negativna zanka, ki ustavi njegovo sintezo. Takšen učinek imajo nekateri ftalati (Allner in sod., 1997).

Drug primer anti-androgenega delovanja je sintetični hormon 17α -etinilestradiol (EE2), ki ga najdemo v kontracepcijskih tabletkah. Etilna skupina, ki je pripeta na C17 pozicijo ogrodja steroida, ščiti EE2 pred želodčno kislino in zavira njegovo razgradnjo, saj sterično ovira dostop do 17-hidroksilne skupine, kjer dostopajo encimi. Etilna skupina hkrati zmanjša afiniteto EE2 za vezavo na steroid-vezavne proteine (SBP), kar je zelo pomembno pri nosečnicah. SBP proteini imajo namreč skupaj s testosteronom pomembno vlogo pri oblikovanju indentitete spola v možganih zarodka (v drugem trimestru nosečnosti). SBP proteini so v cerebro-spiralni tekočini v visokih koncentracijah in eksogenemu (iz matere)

estradiolu preprečujejo prehod skozi možgansko bariero, tako da ga vežejo nase. Zaradi odsotnosti estradiola lahko testosteron pravilno oblikuje možgane. EE2, ki se nerad veže na SBP, pa se tako ne zadržuje v cerebro-spinalni tekočini, ampak dostopa do možganov, zaradi česar se možgani oblikujejo drugače. Ravno neoviran prehod EE2 do možganov omogoča temu hormonu višjo hormonsko aktivnost od E2, ki je naravni estrogen z največjo estrogeno aktivnostjo (McEwen in sod., 1975). Hormonske kontracepcijske tabletko, ki vsebujejo EE2, se tako imenujejo nizkodozne, saj že nizka 'doza' tega hormona doseže enak učinek kakor visoka 'doza' E2.



Slika 2: Pretvorba mestranola v EE2 (Ternes in sod., 1999)

Naravni in sintetični estrogeni delujejo že pri zelo nizkih (ng/l) koncentracijah, medtem ko je večina drugih spojin z estrogenim delovanjem biološko aktivna šele v koncentracijah µg/l oz. mg/l, kar so ugotovili s poskusi z vodnimi organizmi. Če postrvi šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) izpostavimo 1-10 ng/l koncentraciji E2 (Routledge in sod., 1998) ali 0,1-10 ng/l koncentraciji EE2 (Purdom in sod., 1994), lahko pri samcih zaznamo vitelogenin (Vtg), ki je značilen za samice in ga samci običajno ne sintetizirajo. Tudi alkilfenoli imajo tak učinek, vendar šele pri koncentracijah 1-10 µg/l (Routledge in sod., 1998). Upoštevati moramo tudi možne aditivne ali sinergistične učinke mešanice estrogenov in/ali ksenoestrogenov (Thorpe in sod., 2003).

Ksenoestrogeni imajo precej bolj šibko estrogenost od naravnih estrogenov, vendar se pojavljajo v večjih koncentracijah in imajo dolgotrajnejši učinek na okolje. Npr. že od leta 1986 v detergentih ne uporabljajo več nonilfenol polietoksilatov, a te v rekah še vedno zaznavamo v koncentracijah 0,1–0,7 µg/l (Fuerhacker in sod., 2001).

Med ribami je feminizacija, kot odziv na prisotnost estrogenov, pogost in razširjen pojav. Takšno populacijo prepoznamo po ribjih samcih, ki razvijejo sekundarne ženske spolne znake (npr. oocite v gonadah, prisotnost velikih površin tkiva jajčnikov, ali gonade, ki izgledajo kot jajčniki in so polni oocit, vendar so genetsko samci). Gibljivost spermijev in sposobnost oploditve jajčeca sta manjši kakor pri normalnih ribah. Poleg tega manj samcev v populaciji sprosti spermo, če pa jo, je ta redkejša in ima manjši volumen. Feminizacija ali maskulinizacija tako vodita do zmanjšanja ali celo do lokalnega izginotja populacije, če je ta dolgo časa izpostavljena visokim koncentracijam hormonskih motilcev (Sumpter, 2005).

Izpostavljenost tem snovem pa prizadene tudi človeka. Eertmans in sod. (2003) so zbrali podatke o spremembah v človeški populaciji, ki bi jih lahko pripisali izpostavljenosti hormonskim motilcem. Sem spadajo zmanjšanje kvalitete sperme (posledično neplodnost), povečana pojavnost raka na testisih, povečana pojavnost nespuščenih mod in premika sečevodnega kanala na spodnjo stran penisa. Izpostavljenost estrogenom pri ženskah poveča možnost razvoja raka na dojkah in materničnem vratu, saj estrogeni delujejo kot tumorski promotorji, ki spodbujajo proliferacijo celic (Cooper in Hausman, 2004).

Vodno okolje je še posebej občutljivo za onesnaženje, saj v reke, jezera in morje preko čistilnih naprav in industrije namerno izpuščamo odplake. Poleg tega se vanje stekajo snovi nenamernih izlivov cistern, površinskih odtekaajočih vod in atmosferskih naplavin. Pritisk na vodna telesa se je še povečal z večjo porabo vode za potrebe ljudi. Ponekod, v gosto naseljenih območjih, tako iztok čistilnih naprav prispeva več kot 50 % celotnega toka reke, kar lahko v sušnih obdobjih naraste tudi do 90 %. Glede na to, da vsak dan uporabljamo okoli 100.000 sintetičnih spojin, izmed katerih se jih veliko sprosti v kanalizacijo, lahko sklepamo, da neprestano prihajajo v vodotoke. Ravno zaradi tega je potrebno ovrednotiti kakšen učinek imajo te spojine na življenje v vodnem okolju (Sumpter, 2005).

Poleg komunalnih in industrijskih odplak ima pomembno vlogo tudi kmetijska dejavnost. Živali kot so ovce, govedo, prašiči in perutnina, pa tudi druge živali, tako kot človek izločajo steroidne hormone. Shemesh in Shore (1994) sta izmerila vsebnost steroidnih hormonov, ki je 14 – 533 ng/g suhe teže iztrebka, pri čemer je bil E2 v povprečju 44 ng/g.

V urinu živine je Erb s sod. (1977) ugotovil v povprečju 13 ng/l E2. Med drugim se steroidna zdravila uporabljajo za uravnavanje reprodukcije pri živini, v ZDA pa uporabljajo trenbolon acetat (androgen) za spodbuditev nastanka mišične mase. Gnoj teh živali vsebuje 5 – 75 ng/g hidroksiliranega trenbolona (Schiffer in sod, 2001), katerega razpolovna doba je 267 dni. Razlivanje gnojnice na kmetijske površine lahko vodi do pronicanja estrogenov v podtalnico in pitno vodo. Tveganje predstavlja tudi aktivno blato iz čistilnih naprav, saj adsorbira precejšen delež hormonskih motilcev. Tega se predela v anaerobnih digestorjih ali pa ga uporabljajo kot gnojilo za polja, pri čemer znova pride v okolje oz. lahko tudi v pitno vodo.

2.2 MIKROORGANIZMI, SPOSOBNI RAZGRADNJE ESTROGENOV

V zadnjih nekaj letih so znanstveniki poskušali izolirati mikroorganizme, ki so sposobni razgradnje estrogenov, pri čemer gre predvsem za izolate iz aktivnega blata bioloških čistilnih naprav, nekaj pa tudi iz prsti.

Pouwels in sod. (2008) so raziskovali ko-metabolizem EE2 in hkrati izolirali še nekaj bakterijskih vrst iz debela proteobakterij (PB), kot so *Phyllobacterium myrsinacearum* (α -PB), ki je znan kot fiksator dušika na listih, *Ralstonia pickettii* (β -PB), *Pseudomonas aeruginosa* in druge vrste rodu *Pseudomonas* (γ -PB), ter vrste rodu *Acinetobacter* (γ -PB). Omenjeni bakterijski rodovi in vrste niso presenečenje, saj so znani po svoji sposobnosti pretvorbe fenolnih spojin in drugih onesnaževal iz okolja. V isti raziskavi so ugotovili še, da strukturni analogi E1, E2 in do določene mere E3, inducirajo ko-metabolizem EE2. Zaključili so, da se EE2 razgradi v prisotnosti naravnih estrogenov E1 in E2, kot edini vir ogljika pa ne. Večje kot je razmerje E2/EE2, večji odstotek EE2 se odstrani, pri čemer se razgradnja EE2 začne šele, ko se razgradi večina E2.

Bakterije iz rodu *Alcaligenes* so znane po svoji sposobnosti razgradnje fenolov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov in pesticidov, kar lahko pripišemo eni bolj aktivnih bakterijskih dehidrogenaz, ki katalizira tudi pretvorbo E2 v E1 (Donova in sod., 2005).

Amonijak-oksidirajoče bakterije same sicer ne razgrajujejo naravnih estrogenov, pripomorejo pa k znižanju estrogenske aktivnosti s produkcijo dušika v obliki NO_2 v procesu oksidacije NH_4 . Taka »razgradnja« oz. nitratacija estrogenov zahteva precej visoke koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ (>100 mg/l), kar je mogoče le pri odpadni vodi iz objektov intenzivne reje živali in v ločeno zbranem urinu, kar že izvajajo v Avstriji, Nemčiji, na Nizozemskem in Švedskem (Maurer in sod., 2006). Nitro-E1 in nitro-E2 imata manjšo zmožnost vezave na humani estrogenski receptor (hER), vendar je tudi njuna biorazgradljivost manjša, saj se nitro-E1 razgrajuje 11-krat počasneje kot E1, nitro-E2 dvakrat počasneje kakor E2 in nitro-EE2 štirikrat počasneje od EE2 (Gaulke in sod., 2009).

2.3 USODA ESTROGENOV V ČISTILNIH NAPRAVAH

Odrasla ženska z normalnim menstrualnim ciklom na dan izloči tudi preko 100 μg naravnih estrogenov, odvisno od faze cikla in starosti ženske. D'Ascenzo s sod. (2002) je z analizo urina žensk izmeril največ estriola (E3, 106 $\mu\text{g}/\text{dan}$), estrona (E1, 32 $\mu\text{g}/\text{dan}$) pa je bilo dvakrat več kakor estradiola (E2, 14 $\mu\text{g}/\text{dan}$).

Večina estrogenov, ki se izločijo z urinom, je v neaktivni obliki. Estrogeni hormoni, ki so topni v maščobah, se v jetrih konjugirajo z glukuronidom ali sulfatom, kar poveča topnost v vodi (oz. urinu) in s tem olajša njihovo odstranjevanje iz telesa (Williams in Stancel, 1996). Estrogeni sulfati (E-S) predstavljajo približno 22 % vseh konjugiranih estrogenov, ostalo so glukuronidi (E-G). Od konjugiranih E1 jih je kar 25 % v E1-3S obliki (D'Ascenzo in sod., 2002). Med glukuronidi so najpogostejši E3-3G, E2-3G in E2-17G (Römbke in sod., 1996; cit. po Ternes in sod., 1999), kjer številka (2 ali 17) označuje pozicijo na sterolnem ogrodju.

Pri nosečnicah dosejajo dnevne doze izločenih estrogenov tudi do več 10 mg, predvsem E3 (Baronti, 2000), prav tako pa je delež prostih estrogenov bistveno večji. Ženske, ki jemljejo nizkodozne kontracepcijske tabletko, zaužijejo dnevno količino od 20-35 μg 17α -etinilestradiola (EE2) (tabletko Logest, Yarina). Že 1 - 2 uri po zaužitju doseže EE2 v plazmi maksimalno koncentracijo, njegov razpolovni čas pa je 9 - 27 ur. Po 24 urah ostane

v plazmi le 3 % EE2 iz kontracepcijskih tabletk, 60 % se ga izloči z urinom, preostanek pa se presnovi v telesu (Carr in Griffin, 1998).

Moški izločijo 2 - 25 µg estrogenov/dan in ženske v menopavzi 5 - 10 µg/dan (Williams in Stancel, 1996). Z blatom se iz telesa izloči le 5 – 10 % vseh estrogenov, od tega jih je 58 - 90 % prostih oz. nekonjugiranih (Adlercreutz in Jarvenpaa, 1982).

Dekonjugacija estrogenov poteka že v kanalizaciji na poti do čistilne naprave. K temu pripomore bakterija *Escherichia coli*, ki izloča encim z β-glukuronidazno aktivnostjo (Dray in sod., 1972) in šibko arilsulfatazno aktivnostjo (Shackleton, 1986). V blatu je *E. coli* prisotna v velikem številu.

2.3.1 Odstranjevanje hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem na bioloških čistilnih napravah

Glavni namen bioloških čistilnih naprav je pretvorba topnega in koloidnega biološkega materiala v biomaso, CO₂ in vodo, pri čemer se odstranijo organski ogljik, dušik in fosfor. Pomembno je ugotoviti ali biološke čistilne naprave res odstranjujejo proste estrogene, ki nastanejo med čiščenjem ali jih samo pretvorijo z naravno dekonjugacijo, ki jo opravljajo bakterijski encimi in so tako pomemben vir biološko aktivnih estrogenov.

Estrogeni na čistilnih napravah se lahko odstranjujejo iz vodnih suspenzij na dva načina: z adsorpcijo in biorazgradnjo. E2 v odpadni vodi v koncentracijskem območju nekaj ng/l ima majhno težnjo za adsorpcijo na delce. E3 je v vodi bolj topen kakor E2 in ima še manjšo afiniteto za vezavo na delce, zato se oba hormona pretežno odstranjujeta z biorazgradnjo (Baronti in sod., 2000). Čeprav se na aktivno blato veže približno 61 % E1, 66 % E2 in 70 % EE2, se ti hormoni še vedno v večini odstranjujejo z nadaljno biorazgradnjo (Andersen in sod., 2005). Adsorpcija E1 na aktivno blato je delno odvisna od celične površine živih mikroorganizmov, saj se E1 v avtoklaviranem aktivnem blatu, kjer so proteini v membrani denaturirali zaradi visoke temperature, adsorbira v bistveno manjši meri, kot na živo aktivno blato (Suzuki in Maruyama, 2006). Odstranitev estrogenov samo z adsorpcijo na trdne delce je kljub temu zanemarljiva (3 %) (Andersen in sod., 2005).

obstojnega. Po 24 urah v stiku z aktivnim blatom koncentracija pade le za 20 %, nakar se razgradnja ustavi.

EE2 najbolje odstranjujejo čistilne naprave z nitrifikacijskim bazenom. Predvidevajo, da je razgradnja povezana z encimom monoooksigenaza. Kaže pa se tudi linearni odnos z biotransformacijo NH_3 (Yi in Harper, 2007). Zuo in sod. (2006) so ugotovili, da fotoliza EE2 pod vplivom sončne svetlobe povzroča glavnino zmanjšanja količine tega estrogena v površinski morski vodi, z razpolovno dobo 1,5 dni.

Učinkovitost odstranjevanja estrogenov v BČN z aktivnim blatom se med raziskavami razlikuje, v večini pa veljajo podatki v Preglednici 2.

Preglednica 2: Učinkovitost odstranjevanja in končne koncentracije v iztokih za različne estrogene (Des Mes in sod., 2008)

Estrogen	E1	E2*	E3	EE2
Učinkovitost (%)	62 ± 27	88 ± 9	95	56 ± 24
Končne konc. v iztoku (ng/l)	13,9 ± 14,3	2,1 ± 2,7		1,7 ± 4,3

* V iztokih čistilnih naprav brez biološkega čiščenja so lahko koncentracije E2 tudi do 48 ng/L (Desbrow in sod., 1998).

Pretočne rastlinske čistilne naprave (vodna leča in alge) so primerljive z BČN z aktivnim blatom, saj je učinkovitost odstranjevanja E1, E2 in tudi EE2 od 83,9 – 94,4 % (Shi in sod., 2010). Mehanizem odstranjevanja temelji na sorpciji estrogenov v rastline (predvsem vodna leča) in mikrobnii biorazgradnji. Retenzijski čas takih RČN je 10 - 20 dni in zahtevajo redno žetev rastlin.

V primeru, da so fenolne spojine z estrogensko aktivnostjo prisotne, so koncentracije le-teh na vtoku ponavadi visoke (lahko tudi več mg/l) in na iztoku lahko še vedno dosežajo več 100 µg/l. Kljub temu na vodne organizme nimajo večjega vpliva, saj se njihova estrogenost izrazi pri višjih koncentracijah kakor pri naravnih estrogenih. Učinkovitost odstranjevanja teh spojin je 64 – 92 %, odvisno od vrste čistilne naprave, pri čemer sta nabolj učinkoviti BČN z aktivnim blatom in ČN z dvema oksidacijskima bazenoma (Ying in sod., 2008)

V okolju so problematični neionizirani nonilfenol polietoksilati NPEO (površinsko aktivne snovi), ki sami po sebi sicer nimajo estrogenske aktivnosti, vendar mikrobnost katalizira nastanek estrogenih intermediatov NPEO1, NPEO2 in 4-nonilfenola (Ying in sod., 2008). Površinsko aktivne snovi se v aerobnih razmerah hitro razgradijo z oksidacijo in skrajšanjem hidrofilne polietoksilatne verige, kjer lahko bakterije potencialno uporabijo odcepljene etoksi skupine kot vir hranil. Popolna mineralizacija je zaradi visoko razvejane hidrofobne alkilne skupine na fenolnem obroču redka. Biorazgradnja nastalih intermediatov (nonilfenol, oktilfenol, mono do tri-etoksilat alkilfenoli) poteka bolj počasi zaradi prisotnosti benzenskega obroča in njihove omejene topnosti v vodi. Alkilfenoli (AP; primer 4-NP) so zelo lipofilni in se radi adsorbirajo na trdno fazo, kar jih naredi manj biorazgradljive. Alkilfenol karboksilati (APEC), še ena skupina ksenoestrogenov, so za razliko od NPEO bolj vodotopni in je zato njihova vezava na trdne delce omejena (Auriol in sod., 2006).

Poliklorirani bifenili (PCB) so stabilne molekule, slabo topne in dobro obstojne, zato je njihova biorazgradnja minimalna in se odstranjujejo večinoma preko adsorpcije na suspendirano snov in kosmiče aktivnega blata. Tako jih delno odstranimo že s primarno sedimentacijo. Bisfenol A (BPA) pa je dobro biorazgradljiv (Lintelmann in sod., 2003).

Največje tveganje za okolje torej predstavljajo E1, E2, EE2 in 4-NP, saj imajo najvišjo estrogensko aktivnost, so obstojne, 4-NP pa se poleg tega v organizmih še bioakumulira. Problemi se pojavljajo v poletnih časih, ko imajo reke nižje pretoke in je posledično koncentracija estrogenov v rekah večja.

2.3.2 Druge metode odstranjevanja estrogenov

Kloriranje, obdelava z ozonom in drugi oksidativni procesi, odstranjevanje z MnO₂, ter fotolitske reakcije z UV so metode, ki so jih preizkušali na vodah z visoko koncentracijo estrogenov, in ne v ng do µg/l koncentracijah, ki so ekološko pomembne. Večinoma uspešno odstranjujejo naravne estrogene, vendar so bili nekateri razgradni produkti še vedno estrogensko aktivni ali pa so bili celo kancerogeni, npr. po kloriranju (Auriol in sod., 2006).

PAC (powdered activated carbon) oz. aktivno oglje v prahu ali GAC (granular activated carbon) lahko odstranita velike količine hormonskih motilcev, ki so prisotni v nizkih koncentracijah. Metoda je še posebej učinkovita v kombinaciji z membransko filtracijo.

Tudi filtracijski procesi (našteti po učinkovitosti: reverzna osmoza, nanofiltracija, ultra- in mikro- filtracija), kot hibridni ali samostojni procesi, dosegajo relativno visok odstotek odstranitve hormonskih motilcev. Metode so drage in zahtevajo stalno vzdrževanje zaradi mašenja filtrov. Še ena uspešna metoda so membranski bioreaktorji, ki kombinirajo adsorpcijo in biorazgradnjo ter tako hkrati odstranjujejo ogljikove, fosforjeve in dušikove spojine (CPN) in hormonske motilce (Auriol in sod., 2006).

2.4 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV

Preden se lotimo ugotavljanja prisotnosti in aktivnosti hormonskih motilcev v odpadnih vodah, je potrebno le te skoncentrirati. Hormonski motilci z estrogenim delovanjem so namreč v odpadnih vodah prisotni v zelo nizkih koncentracijah. Metode za zaznavo omenjenih snovi nimajo dovolj nizke občutljivosti, da bi zaznali tako majhne koncentracije. Poleg tega so nekatere metode za zaznavo hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem občutljive na prisotnost strupenih snovi, zato je smiselno izvesti dodatno čiščenje vzorca.

2.4.1 Predpriprava vzorcev - koncentriranje

Za koncentriranje vzorcev lahko uporabimo adsorpcijsko kromatografijo. V splošnem nam pri tej metodi kot adsorbent služi nosilec, ki ima na svoje površje vezane različno nabite skupine oziroma bolj ali manj polarne radikale. Stacionarna faza je trdna, mobilna pa tekoča. Izvajamo jo v kolonski tehniki.

Za naš namen lahko uporabimo vrsto adsorpcijske kromatografije, imenovano ekstrakcija na trdni fazi (solid phase extraction – SPE) z reverzno fazo, kjer je tekoča faza polarna, trdna pa modificirana, nepolarna. Deluje na principu hidrofobnih interakcij. Kolone so po

navadi napolnjene s silikati, ki imajo vezane alkilne (C_nH_{2n+1}) in arilne (derivati aromatskega obroča) hidrofobne funkcionalne skupine (Sigma-Aldrich, 1998).

Vzorec, ki ga nanašamo, je v polarnem mediju (npr. voda). Napolarni analit se preko svojih C – H vezi veže na funkcionalne skupine na površju silikata. Ker določen odstotek v polnilu predstavljajo ostanki silanolov (Si-OH), ki niso reagirali s silani pri tvorbi funkcionalnih skupin, lahko pride do sekundarnih interakcijskih mest, kamor se vežejo polarne spojine, ponavadi nečistoče. Te lahko speremo s polarnim topilom (npr. 5 % metanol v vodi), ki se veže preko vodikovih vezi na te skupine in izpodrine nečistoče.

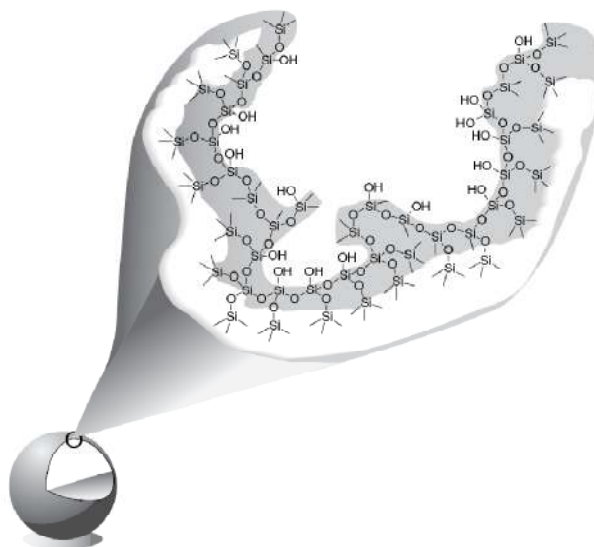
Elucijo analita s polnila dosežemo z nanosom nepolarnega topila, ki prekine hidrofobne interakcije med nosilcem in analitom.

Metoda je še posebej primerna v raziskavah z okoljskimi vzorci, saj dopušča uporabo velikega volumna vzorca in lahko obdelujemo več vzorcev hkrati. Prav zato se SPE pogosto uporablja kot metoda za koncentriranje vodnih vzorcev, v katerih želimo ugotoviti prisotnost organskih onesnaževal (Sigma-Aldrich, 1998; Wells, 2003).

2.4.2 Predpriprava vzorcev – dodatno čiščenje

Dodatno čiščenje izvajamo, kadar nečistoče motijo izvedbo nadaljnih analiz. Iskane spojine od nečistoč ločimo na podlagi njihove (ne)polarnosti. Tako kakor pri koncentriranju, tudi pri dodatnem čiščenju uporabljamo vrsto adsorpcijske kromatografije, imenovano SPE z normalno fazo, kjer uporabljamo kolone polnjene s silikagelom.

SPE z normalno fazo deluje na principu hidrofilnih interakcij. Tekoča faza je delno polarna ali nepolarna, trdna pa polarna. Na polnilo se torej s hidrofilnimi interakcijami vežejo močno polarne spojine. Analiti tako potujejo skozi kolono ne da bi se vezali, neželjene spojine pa se adsorbirajo na silikat.



Slika 4: Prikaz neobdelanega silikatnega delca (Wells, 2003)

Polnilo je sestavljeno iz neobdelanega silikata, ki je zaradi hidroksilnih funkcionalnih skupin na površju zelo hidrofilen (Sigma-Aldrich, 1998).

2.4.3 Biološke metode (biotesti)

Delimo jih na imunološke metode, *in vivo* teste in *in vitro* teste, v njih pa uporabljamo protitelesa, celice ali žive organizme.

Imunološke metode vključujejo teste ELISA in RIA. Temeljijo na reakcijah estrogenov (antigeni) s protitelesi, ki so adsorbirana na stene luknjic mikrotitrskih plošč. Z dodatkom encimsko ali radioaktivno označenega estrogena zapolnimo preostala prosta mesta na protitelesih. Več estrogena je prisotnega v vzorcu, manj označenega estrogena se bo vezalo na protitelesa (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

In vivo testi upoštevajo učinek metabolizma, vezavo spojin na plazemske proteine in farmakokinetiko. Neka snov lahko izzove v organizmu dva različna odziva (npr. v dveh različnih organih). Z njimi lahko ocenimo tveganje izpostavljenosti tem snovem (Eertmans in sod., 2003). Najpogosteje uporabljena metoda *in vivo* je metoda, ki temelji na določanju vitelogenina v krvi samcev in mladica rib zebrič *Danio rerio*, t. i. **ELISA-Vtg** (Vtg Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Med spolnim dozorevanjem samice v gonadah

sintetizirajo 17 β -estradiol (E2). V hepatocitah se E2 veže na receptor, kar sproži transkripcijo gena za vitelogenin. Vitelogenin je prekursor jajčnega rumenjaka, ki se praviloma izraža le pri samicah. Kadar je v vodi prisotna povečana koncentracija estrogensko aktivnih spojin, nastaja vitelogenin tudi pri samcih in mladica. Test je osnovan na specifični vezavi med vitelogeninom in z markerji označenimi protitelesi. Encimska aktivnost markerja na protitelesu je proporcionalna koncentraciji vitelogenina in jo določamo spektrofotometrično (Sumpter in Jobling, 1995). Slabost testa je nestabilnost proteina vitelogenina, saj se njegova koncentracija v plazmi spreminja. Test ne upošteva kompleksnosti celotnega endokrinega sistema, še posebej v primeru težko biorazgradljivih sintetičnih organskih snovi, zato je potrebno spremljati še druge znake, kot so embriogeneza, uspešnost reprodukcije, rast razvijajočih se osebkov (Sumpter, 2005).

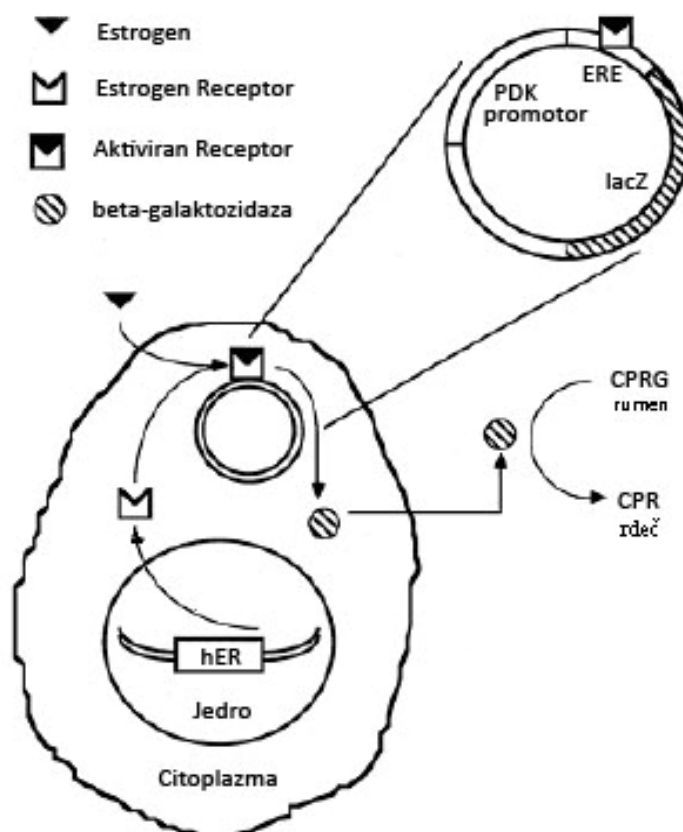
In vitro testi preverjajo estrogensko aktivnost na nivoju celic, kar se kaže v njihovi vezavi na estrogenski receptor in v njegovi aktivaciji. Metode so hitre, ponovljive in cenovno ugodne, preverjamo lahko več vzorcev hkrati. Njihova slabost pa je, da ne upoštevajo faktorjev, ki bi lahko vplivali na njihovo estrogenost v organizmu, npr. afinitete spojine za vezavo na proteine, sposobnost vstopa v tarčne celice, čas razgradnje v organizmu in koncentracije endogenih estrogenov (Andersson in sod., 1999).

Testi z reporterskim genom temeljijo na sprožitvi prepisovanja gena zaradi aktivacije receptorja s snovjo, ki je estrogensko aktivna. Testni organizmi so kvasovke ali sesalske celične linije (MCF7, COS1), v katere so vnesli plazmid z reporterskim genom, vezanim na hormonski odzivni element (HRE). Reporterski geni ponavadi kodirajo encim β -galaktozidaza ali luciferaza (Eertmans in sod., 2003), ki ob dodatku substrata povzročijo neko vidno spremembo (barvo ali intenzitete svetlobe).

2.4.3.1 YES (Yeast Estrogen Screen) test

Test za ugotavljanje prisotnosti estrogenov in estrogensko aktivnih snovi v vzorcu so razvili na Oddelku za genetiko v Glaxo (UK) pod vodstvom profesorja Sumpterja (1996). V kromosom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so vnesli DNA zaporedje človeškega estrogenskega receptorja (hER). Poleg tega vsebujejo celice še ekspresijski plazmid, ki nosi zapis za reporterski gen *lacZ*, ki kodira encim β -galaktozidazo. Na začetku

reporterskega gena je estrogen-odzivni element (ERE), ki je skupaj z reporterskim genom pod istim močnim promotorjem.



Slika 5: Shematski prikaz ekspresijskega sistema v gensko spremenjeni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in aktivacije sistema z estrogenom (Routledge in Sumpter, 1996).

V vzorcu prisotna estrogensko aktivna spojina se veže na hER. Dimerni kompleks se nato skupaj s transkripcijskimi faktorji veže na ERE, kar sproži sosledje reakcij, med katerimi sta glavna prepisovanje genov za sintezo novih receptorjev in prepisovanje *lacZ* za sintezo encima, ki se izloča v gojišče.

Encim razgradi rumeno obarvan substrat klorofenol rdeče-β-D-galaktopiranozid (CPRG) do rdeče – vijolično obarvanega produkta klorofenol rdeče (CPR), katerega absorbanco spektrofotometrično izmerimo pri 540 - 575 nm. Spodnja meja detekcije YES testa je 0,05 ng E2 ekvivalentov/l (Stuer-Lauridsen in sod., 2005).

2.4.4 Kemijske metode

Kemijske metode uporabimo, ko smo v vzorcu potrdili estrogensko aktivnost z enim izmed biotestov. V večini se uporabljajo metode kot so visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), plinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom (GC-MS), tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom (LC-MS) in mikroekstrakcija na trdnih nosilcih, ki se nato nadaljuje v GC-MS (SPME/GC-MS).

2.5 IZGUBE ESTROGENOV MED ANALIZO

Walker in Watson (2010) sta preučevala adsorpcijo estrogenov na laboratorijski material, kar lahko igra pomembno vlogo v analizah, kjer so prisotne majhne količine estrogenov in je zato kakršnakoli izguba pomembna. Ugotovila sta, da v prvih 6-ih urah ni bistvenega učinka adsorpcije na material v primeru E2, pri E1 in EE2 pa se adsorpcija začne po 3 urah. Estrogeni se najbolje adsorbirajo na polikarbonatno plastiko in nerjaveče jeklo, tudi do 50 %. Problem nerjavečega jekla je še njegova potencialna sposobnost razgradnje, oziroma tvorbe metabolitov E2. Teflon in PVC vežeta nase minimalne količine estrogenov (1 % ali manj). Do najmanjše izgube pa pride, če uporabljamo steklo, tako v primeru prostih, kot tudi konjugiranih estrogenov.

Kadar imamo opravka z zelo nečistim vzorcem, ki vsebuje večje delce, je priporočljivo vzorec prej filtrirati, saj drugače prihaja do mašenja in neenakomerne porazdelitve vzorca po koloni. Paziti moramo, da materiali iz katerega so filtri, nimajo vezavnih mest za organske snovi, kar bi omogočilo adsorbcijo na njih in s tem izgubo analita. Pri tem koraku je nevarnost izgube analita tudi zaradi morebitne adsorbcije na delce, ki jih odstranjujemo s filtriranjem (Bulletin 910, 1998; Wells, 2003). Stuer-Lauridsen in sod. (2005) so ocenili, da je izguba med postopkom SPE med 2 – 27 %, ne glede na iskano snov, med čiščenjem s silikagelom pa 7 - 24 %, odvisno od estrogena.

Včasih se postopkov ne moremo lotiti takoj, ko dobimo vzorce, zato jih je potrebno za določen čas shraniti. (Ne)konjugirane estrogene lahko shranjujemo relativno dolgo časa, saj so pri temperaturi 4 °C in pH 3 stabilni kar 7 dni (Stuer-Lauridsen in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Vzorci, ki smo jih testirali, smo odvzeli na vtoku in iztoku iz štirih čistilnih naprav v Sloveniji. Na čistilni napravi A in B doteka komunalna odpadna voda, na C poleg komunalne tudi industrijska odpadna voda, v primeru D pa teče odpadna voda iz objektov reje živali (prašiči). Do laboratorija smo jih prinesli v 3 litrskih plastičnih posodah v hladilni skrinji. Vzorce smo označili s črkami A, B, C in D, številka 1 predstavlja vtok, številka 2 pa iztok.

Ker so spojine z estrogensko aktivnostjo v odpadnih vodah prisotne v zelo majhnih koncentracijah (ng/l), smo pred samim poskusom ugotavljanja prisotnosti le-teh z YES testom izvedli še postopek koncentriranja oz. ekstrakcijo na trdni fazi.

3.1.1 Predčiščenje vzorcev

Pred koncentriranjem smo iz vodnih vzorcev odstranili suspendirane delce. Vzorce, ki so vsebovali večje delce, smo najprej centrifugirali (8000 rpm, 10 min, 4 °C), nato pa še filtrirali skozi acetatne filtre (Sartorius) s porami velikosti 1,2, 0,8 in 0,3 µm z uporabo vodne črpalke. V primeru vzorcev s čistilne naprave D smo zaradi visoke vsebnosti suspendiranih delcev izvedli še prefiltracijo z uporabo filtrov (Sartotius, črni trak). Zaradi mašenja filtra smo po filtraciji skozi filter s porami 0,8 µm vzorec redčili z ultračisto vodo v volumskem razmerju 1:1.

3.2 POSTOPEK KONCENTRIRANJA

Pri postopku SPE (ekstrakcija na trdni fazi) z reverzno fazo smo uporabili kolone proizvajalca Waters Oasis® s polnilom Oasis® HLB 60 µm (Hydrophilic-Lipophilic Balance Sorbent). Kolone s polnilom tehtajo 500 mg. Specifična površina polnila je v območju 727 – 889 m²/g, povprečni premer por je od 73 do 89 Å. Vsebujejo polnilo, ki ima po sestavi ustrezno hidrofilno/lipofilno ravnotežje, kar omogoča visoko vezavno

kapaciteto za kisle, bazične in nevtralne snovi (OASIS® HLB Extraction Cartridges, 2000).

Začetni volumni posameznih vzorcev so bili 250 ml tako za vtok kakor za iztok. Izjema so le vzorci čistilne naprave D, kjer je bil začetni volumen sicer tudi 250 ml, vendar smo ga prej redčili z ultra čisto vodo v razmerju 1 : 1. Torej je bil prvotno začetni volumen vzorca D 125 ml za vtok in prav tako za iztok čistilne naprave D.

Pred nanosom vzorcev smo kolone najprej ustrezno aktivirali. Vsako kolono smo najprej uravnovesili s 5 ml metanola. Preostanek topila v koloni smo sprali s 5 ml ultra čiste destilirane vode (miliQ) in nato nanесли vzorec vtokov in iztokov (250 ml). Za tem je sledilo spiranje nečistoč s 5 ml 5 % metanola. Kolone smo sušili s prepihanjem z dušikom skozi Visidry™ Drying Attachment (Supelco, Bellefonte, ZDA), da smo odstranili vodo. Po končanem sušenju je sledilo spiranje iskanih snovi z metanolom (4 ml). Vzorec smo nato skoncentrirali s sušenjem do 1 ml in ga prenesli v reakcijsko stekleničko, ki smo jo do nadaljne uporabe spravili v zamrzovalnik pri -20°C .

Vzorci smo s takim postopkom skoncentrirali za 250-krat, oziroma v primeru vzorcev D za 125-krat. Izraženo v odstotkih pomeni, da smo po koncentriranju imeli 25.000-odstotne (oz. 12.500 %) koncentrate. Koncentrat smo nato redčili 2-krat, potem pa dodali 200 μl kvasovk. Koncentrati z vrednostjo manj od 1 so redčene vrednosti originalnega vzorca.

3.3 DODATNO ČIŠČENJE VZORCEV

Pri dodatnem čiščenju vzorcev z metodo SPE z normalno fazo smo uporabili SPE kolone proizvajalca Sigma-Aldrich® Supelclean™ LC-Si SPE, s polnilom silikagel (nepravilne oblike). Kolone s polnilom tehtajo 500 mg, njihov volumen pa je 3 ml. Specifična površina polnila je $475\text{ m}^2/\text{g}$, povprečni premer por je 60 \AA , velikost delcev pa $45\text{ }\mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich, 2010).

Kolone smo najprej uravnovesili z 2 ml etilacetata. V reakcijski steklenički, kjer je bil vzorec po SPE koncentriranju v metanolu, smo izsušili (izhlapeli metanol) z metodo izpihavanja z elementarnim dušikom, saj bi metanol drugače spremenil lastnosti kolone.

Vzorec smo nato raztopili v 1 ml etil acetata ter premešali. Ko smo nanegli vzorec na kolono, smo ga hkrati tudi že začeli zbirati, saj se na kolono vežejo nečistoče, estrogeni pa ne. Kolone smo nato sprali še z 10 ml 2 % acetona v etilacetatu, da smo odstranili morebitno vezane bolj polarne estrogene, zato smo eluat še vedno zbirali v stekleničko. Po eluciji smo vzorec posušili do konca, da sta obe topili izhlapeli in dodali 1 ml metanola. Celoten volumen smo prenesli v vialo in do uporabe shranili pri -20°C .

3.4 POSTOPEK DEKONJUGACIJE

Z dekonjugacijo smo želeli aktivirati morebitne neaktivne oblike naravnih estrogenov in EE2, saj konjugirani estrogeni nimajo estrogene aktivnosti. Dekonjugacijo smo zaradi lažje priprave raztopine encima izvajali na vseh vzorcih hkrati.

Hidrolizo naravnih estrogenov lahko izvajamo pred ali po ekstrakciji vzorca s SPE. Postopek dekonjugacije smo izvedli z encimom β -glukuronidaza (proizvajalca Sigma-Aldrich) pri temperaturi $37 - 55^{\circ}\text{C}$ za določen čas ($3 - 24$ h), odvisno od navodil proizvajalca in temperature. V našem primeru je inkubacija trajala 24 h pri 40°C . Encim lahko izoliramo iz govejih jeter, bakterije *Escherichia coli* ali mehkužcev. Slednji so med naštetimi edini, ki proizvajajo encim, ki ima poleg glukuronidazne tudi aril-sulfatazno aktivnost (Gabet in sod., 2007). Kljub temu pa encim ne hidrolizira konjugatov, kot sta E2-17S in E2-3,17S, saj nima alkil-sulfatazne aktivnosti. Omenjenih konjugatov ljudje ne izločamo in ju zato tudi ne pričakujemo v odpadni vodi (Stuer-Lauridsen in sod., 2005).

Najprej smo pripravili 0,3 M Na-acetat (2,4609 g v 100 ml ultračiste vode) in 1 M očetno kislino (286 μl 99,5 % očetne kisline v 4,714 ml ultračiste vode), iz katerih smo nato pripravili 0,1 M acetatni pufer (2,882 ml 1 M očetne kisline in 27,33 ml 0,3 M Na-acetata in ultračisto vodo do 100 ml). pH smo uravnali na vrednost 5 s HCl oz. NaOH.

Za pripravo raztopine encima smo v 100 ml acetatnega pufru dodali 1 ml encima, da smo imeli končno koncentracijo encima 1000 enot/ml. Uporabili smo raztopino encima β -glukuronidaza tipa HP-2 iz velikega vrtnega polža *Helix pomatia*, proizvajalca Sigma-Aldrich. Iz vsake stekleničke smo prenesli 500 μl vzorca v drugo stekleničko in ga posušili

do konca. V stekleničko smo nato dodali 2 ml puфра z encimom in inkubirali pri 40 °C za 24 ur. Tik pred ustavitvijo encimske reakcije smo pripravili 250 ml zakisane vode s pH=3 (ultračista, uravnan z 0,1 M HCl). V stekleničko smo nato odpipetirali 5 ml zakisane vode in vzorce shranili na 4 °C do ponovnega postopka SPE.

3.5 TEST YES

3.5.1 Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*

V poskusih (YES test) smo uporabljali gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991, ki je last korporacije GLAXO (UK), kjer so jo razvili pod vodstvom prof. dr. Sumpsterja. Z njegovim dovoljenjem smo omenjene kvasovke lahko uporabili za izvedbo YES testa v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.5.1.1 Priprava minimalnega gojišča (pH = 7,1)

V oklepaju so navedeni proizvajalci kemikalij.

- 13,61 g KH₂PO₄ (Merck)
- 1,98 g (NH₄)₂SO₄ (Kemična tovarna Podnart)
- 4,2 g KOH (Merck)
- 0,41 g MgSO₄ · 7 H₂O (Merck)
- 1 ml Fe₂(SO₄)₃ raztopine (40mg/50ml H₂O) (Merck)
- 50 mg leucina (Fluka)
- 50 mg histidina (Fluka)
- 50 mg adenina (Fluka)
- 20 mg arginina- HCl (Fluka)
- 20 mg metionina (Fluka)
- 30 mg tirozina (Fluka)
- 30 mg izoleucina (Fluka)
- 30 mg lizina- HCl (Fluka)
- 25 mg fenilalanina (Fluka)
- 100 mg glutaminske kisline (Fluka)
- 150 mg valina (Fluka)
- 375 mg serina (Fluka)

Vse kemikalije smo raztopili v 1 l ultra čiste (miliQ) vode.

Minimalno gojišče smo razlili po 47 ml v 200 ml erlenmajerice in ga nato avtoklavirali (121 °C, 20 minut). Erlenmajerice z minimalnim gojiščem smo hranili pri sobni temperaturi.

3.5.1.2 Priprava rastnega gojišča

Rastno gojišče smo pripravili sterilno po spodnjem receptu, tako, da smo v minimalno gojišče (45 ml) dodali sledeče snovi:

- 5 ml raztopine glukoze (Fluka)
- 1,25 ml raztopine aspartatne kisline (Fluka)
- 0,5 ml raztopine vitaminov
- 0,4 ml raztopine treonina (Fluka)
- 125 µl bakrovega (II) sulfata (Carlo Erba reagenti)

3.5.1.2.1 Raztopina glukoze

Sterilizirali smo 20 % w/v (20 g glukoze/100 ml destilirane vode) raztopino glukoze z avtoklaviranjem 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter jo shranili pri sobni temperaturi.

3.5.1.2.2 Raztopina asparaginske kisline

Raztopino asparaginske kisline (4 mg/ml) smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter shranili na sobni temperaturi.

3.5.1.2.3 Priprava raztopine vitaminov

8 mg tiamina (Sigma)

8 mg piridoksina (Sigma)

8 mg pantotenske kisline (Sigma)

40 mg inositola (Fluka)

Vse kemikalije smo raztopili v 180 ml ultra čiste vode ter dodali 20 ml biotinske raztopine (2 mg/100 ml ultra čiste vode) (Fluka). Nato smo vitaminsko raztopino sterilizirali s filtriranjem čez 0,2 µm filter. Hranili smo jo v hladilniku (4 °C).

3.5.1.2.4 Raztopina treonina

Raztopino treonina (24 mg/ml) smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter shranili pri temperaturi 4 °C.

3.5.1.2.5 Bakrov (II) sulfat

20 mM bakrovega (II) sulfata smo sterilizirali s filtriranjem skozi filter z 0,2 µm porami in shranili pri sobni temperaturi.

3.5.1.3 Priprava trdnega rastnega gojišča

V erlenmajerico s 47 ml minimalnega gojišča (MG) smo zatehtali 1,5 g agarja in prilili MG iz druge erlenmajerice (skupaj približno 100 ml). Več tako pripravljenih raztopin smo avtoklavirali (121 °C, 20 minut). Gojišče smo nato ohladili toliko, da je bilo možno erlenmajerico držati v roki in sterilno dodali snovi za rastno gojišče ter premešali. V sterilne petrijevke smo nalili po približno 10 ml gojišča, počakali da se strdi in v sterilni komori posušili kondenz. Plošče smo do uporabe shranili pri 4 °C.

3.5.1.4 Priprava tekoče kulture kvasovk

Z eno kolonijo kvasovk iz trdnega rastnega gojišča smo sterilno s cepilno zanko inokulirali tekoče rastno gojišče in ga inkubirali pri 28 °C od 24 do 28 h na orbitalnem mešalu (140 rpm), dokler optična gostota pri 620 nm ni dosegla navidezne absorbcije okrog 1,0, kar pomeni, da so kvasovke v logaritemski fazi rasti. Za potrebe YES testa smo nato 2 ml kulture z optično gostoto 1.0 nacepili v novo rastno gojišče, oziroma v primeru, da je bila optična gostota pod/nad 1.0, smo nacepili ustrezen volumen, ki smo ga izračunali po naslednji enačbi:

$$V = \frac{1 \cdot 2mL}{(\text{izmerjena}OD_{620})} \quad \dots (1)$$

kjer je V volumen kulture, ki jo dodajamo v rastno gojišče za YES test; 1 predstavlja optično gostoto, ki bi jo morali izmeriti pri valovni dolžini 260nm (OD_{620}), da bi lahko v rastno gojišče dodali 2 ml kulture; 2 ml predstavlja volumen, ki se ga dodaja pri $OD_{620} = 1$; izmerjena OD_{620} pa je optična gostota, ki smo jo izmerili v tekoči kulturi kvasovk, ki jo dodajamo v rastno gojišče za YES test.

3.5.2 Nanos vzorca na mikrotitrsko ploščo

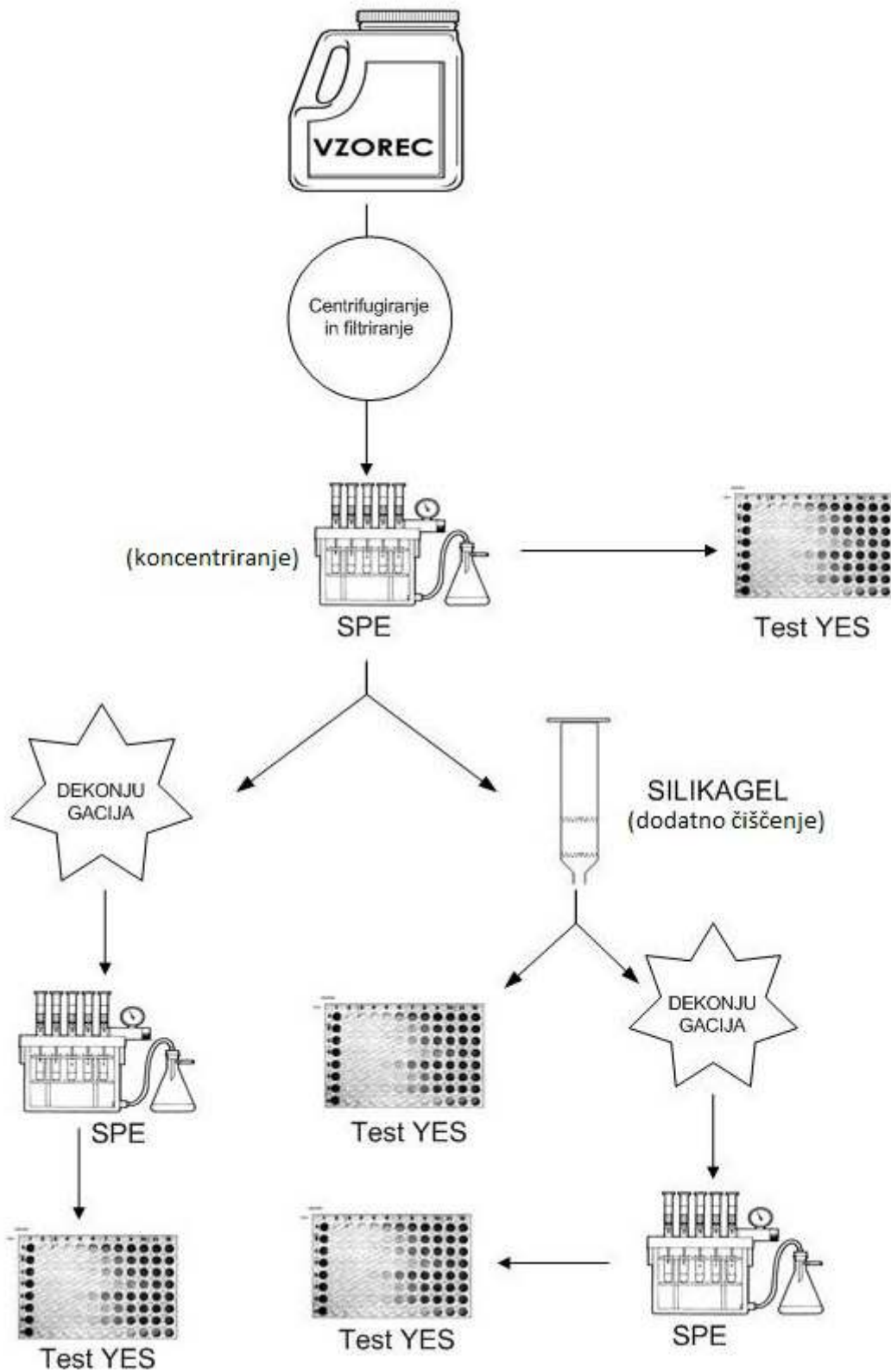
Najprej smo na posebni mikrotitrski plošči izven sterilne komore pripravili vzorce in vse potrebne standarde, ki smo jih redčili v absolutnem etanolu s faktorjem redčitve 2. V sterilni komori smo nato iz vsake luknjice sterilno prenesli po 10 μ l vzorcev in standardov v istoležečo luknjico na novi mikrotitrski plošči. V primeru nanašanja vzorcev po dekonjugaciji smo nanašali po 20 μ l, ker smo za dekonjugacijo uporabili le 500 μ l vzorca in smo s tem zagotovili enako koncentracijo estrogenov kot pri ostalih vzorcih.

E2 je predstavljal pozitivno kontrolo, kot naravni hormon z največjo estrogensko aktivnostjo. Meritve pozitivne kontrole smo uporabili za izris standardne krivulje, s katero smo primerjali naše vzorce in izračunali REA. Progesteron (P) smo uporabili kot negativno kontrolo, saj progesteron, ki je tudi steroiden hormon, nima estrogenega učinka.

Plošče smo pustili v laminariju odprte, da je izhlapel ves etanol oz. metanol. Nato smo dodali 200 μ l kvasovk, pripravljenih v rastnem mediju z dodanim substratom CPRG (klorofenol rdeče- β -D-galaktopiranozid).

Poleg prej omenjenih kontrol smo imeli tudi kontrolno gojišča (K_G), kjer smo v luknjice dodali rastno gojišče s kvasovkami brez CPRG. Z njo smo preverjali ali je gojišče primerno za rast kvasovk in če v njem ni snovi, ki dajejo lažno pozitivne rezultate. Luknjice, kjer smo imeli kontrolno CPRG (K_{CPRG}), so vsebovale rastno gojišče s CPRG, brez kvasovk. S tem smo ugotavljali, če se CPRG sam po sebi razgrajuje in tako daje lažno pozitivne rezultate. Slepa kontrola (B) je vsebovala rastno gojišče s kvasovkami in CPRG brez dodanih snovi (npr. E2, P) in brez vzorca. S tem smo potrdili, da kvasovke same po sebi ne reagirajo s substratom CPRG (lažno pozitivni rezultat), ampak se odzovejo le ob indukciji promotorja zaradi prisotnosti snovi z estrogensko aktivnostjo. Hkrati smo rezultate slepe kontrole uporabili tudi kot ničelni vzorec za izračun povprečne absorbance kvasovk brez dodanih snovi/vzorcev (B_{povp}) v enačbi 2.

Mikrotitrsko ploščo smo stresali nekaj minut in jo nato 48 do 52 ur inkubirali pri 34 °C. Po končanem testu smo ploščo spet stresali nekaj minut in na mikročitalcu pri valovni dolžini 575 in 620 nm odčitati absorbance.



Slika 6: Shema eksperimenta (glavni postopki)

3.5.3 Izračun (relativne) estrogenske aktivnosti vzorcev

Pri 575 nm smo merili absorbanco razgradnega produkta CPRG, saj ima klorfenol rdeče (CPR) pri tej valovni dolžini absorpcijski maksimum. Pri 620 nm smo merili absorbanco zaradi rasti kvasovk. Aktivnost encima, ki je razgradil CPRG, smo nato izračunali po naslednjih korakih:

$$Ta = A_{575} - (A_{620} - B_{povp}) \quad \dots (2)$$

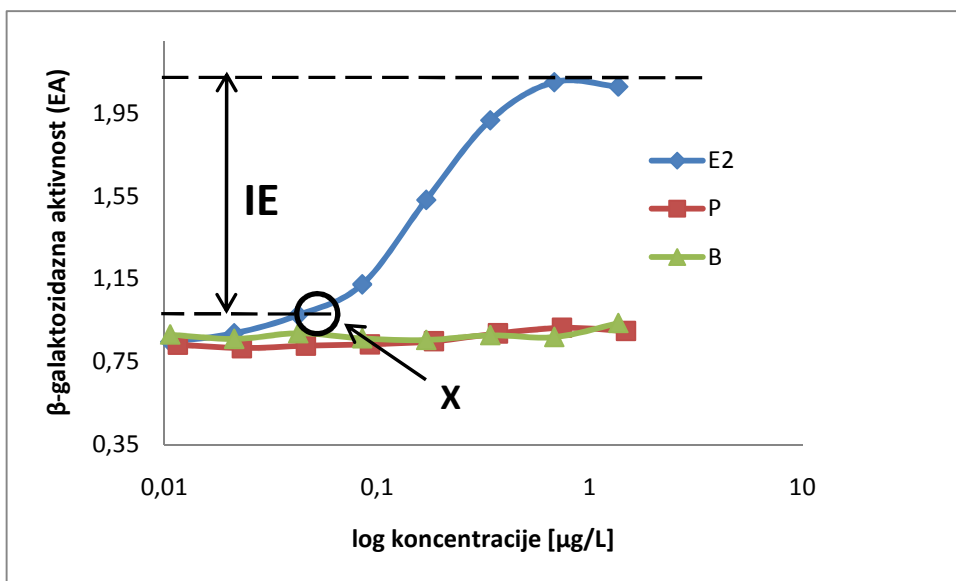
Kjer je Ta = aktivnost β -galaktozidaze oz estrogenska aktivnost; A_{575} = absorbanca, izmerjena pri 575 nm; A_{620} = absorbanca, izmerjena pri 620 nm; B_{povp} = absorbanca povprečja ničelnega vzorca (izmerjena pri 620 nm);

Relativno estrogensko aktivnost naših vzorcev smo izračunali po naslednji enačbi:

$$REA = \frac{Ta - X}{IE} \cdot 100 \quad \dots (3)$$

Kjer je REA = relativna estrogenska aktivnost vzorca (%); Ta = vrednost aktivnosti β -galaktozidaze, izračunana po enačbi (1); X = začetna točka intervala estrogenosti (točka na krivulji standarda E2, najbližja krivulji ničelnega vzorca B); IE = interval estrogenosti, določen na krivulji standarda E2 z začetno točko X ter končno, najvišjo točko krivulje standarda E2 (Slika 8). Relativnost estrogenske aktivnosti se nanaša na interval estrogenosti standarda E2, saj REA izračunavamo glede na podatke iz krivulje estrogenske aktivnosti (slika 7) tega standarda.

Anderssen in sod. (1999) so postavili kriterij, kjer je REA , večja od 75 %, pomenila močno estrogen vzorec, 25 – 75 % delno estrogen vzorec, 10 – 25 % šibko estrogen vzorec in pod 10 % neestrogen vzorec. V našem eksperimentu smo postavili prag estrogenosti pri 20 % na osnovi napak meritev in praktičnih izkušenj.



Slika 7: Prikaz načina izračuna estrogenske aktivnosti

IE – interval estrogenosti; E2 – standard 17β-estradiol; P – progesteron; B – ničelni vzorec; X – začetna točka IE

3.5.4 Izračun zaviranja rasti kvasovk

Zaviranje rasti kvasovk smo izračunali s pomočjo izmerjene rasti po enačbi (4). Rast smo prikazali kot vrednosti absorbance posameznih vzorcev, izmerjene pri 620 nm, ki smo jih delili s povprečno vrednostjo izmerjene absorbance pri 620 nm ničelnih vzorcev B in dobljeno vrednost pomnožili s 100. Nato smo to vrednost odšteli od 100 in tako dobili vrednosti zaviranja rasti. Pri vzorcih, kjer je bilo prisotno več kot 30 % zaviranje rasti, nismo izračunali relativne estrogenske aktivnosti.

$$\text{Zaviranje rasti}(\%) = 100 - \left(\frac{A_{620}}{B_{povp}} \cdot 100 \right) \quad \dots (4)$$

3.6 LIZA KVASNIH CELIC

Pri lizi celic prihaja do sprostitve vsebine celic v njihovo okolje. Ker lahko strupene snovi v vzorcih povzročijo lizo kvasnih celic, nas je zanimalo, če sprostitve vsebine celic vpliva na zaznavanje estrogenske aktivnosti. Celični metaboliti bi lahko namreč oksidirali substrat CPRG in dali lažne pozitivne rezultate.

Liza celic je temeljila na tehniki zamrzovanja, saj le to povzroči pokanje celic in nastanek poškodb celične stene zaradi tvorbe kristalov. Kot medij smo zato uporabili vodo, saj bi snovi v gojišču lahko delovale kot krioprotektanti (snovi, ki ščitijo celico med zamrzovanjem). Za boljšo lizo celic bi morali uporabiti starejšo kulturo, vendar smo se raje odločili za kulturo v isti fazi rasti kot so v samem YES testu, da bi bil metabolni profil čimbolj podoben.

Iz 1 ml kulture kvasnih celic z OD_{620} približno 1.0 smo sterilno v epicah v sterilni ultra čisti vodi redčili vzorec s faktorjem redčitve 2. Epice s kvasovkami smo nato centrifugirali (8000 rpm, ker je bila to zgornja meja centrifuge; 10 minut, 10 °C), odlili supernatant in resuspendirali v 500 µl sterilne ultra čiste vode, da smo sprali preostanek gojišča. Ponovno smo kulturo centrifugirali, odlili supernatant in dodali 500 µl mrzle, sterilne ultra čiste vode.

Kvasovke smo nato zamrznili na -20 °C za 2 uri. Odtajali smo jih v vodni kopeli pri sobni temperaturi (približno 25 °C), intenzivno premešali in ponovno zamrznili za 2 uri. Nato smo jih spet odtajali v vodni kopeli in 10 minut kuhali v vreli vodi, da smo zagotovo lizirali vse kvasovke, ki bi nam drugače lahko dale lažne pozitivne rezultate. V vsako epico smo dodali po 500 µl sterilne ultra čiste vode, da je bil skupni volumen 1 ml.

Iz vsake epice prvih treh redčitev smo na svojo ploščo z rastnim gojiščem sterilno nanесли 100 µl lizata in ga s posebno sterilno spatulo (Drigalski) razmazali po površini agarja. Plošče smo 1 teden inkubirali pri 34 °C. Plošče služijo kot kontrola živosti kvasovk in bi morale po inkubaciji ostati prazne.

V vsako epico smo dodali po 4 µl CPRG, premešali in nato iz vsake epice na mikrotitrsko ploščo nanесли po 200 µl liziranih celic. V primeru mikrotitrške plošče z vzorcem A, smo v luknjice nanесли po 20 µl absolutnega etanola in posušili do konca, da smo jih sterilizirali. Plošče smo inkubirali enako kot pri običajnem YES testu.

4 REZULTATI

Rezultati zaviranja rasti kvasovk so prikazani v preglednicah od 3 do 6 ločeno za vsako čistilno napravo. Vsaka preglednica vsebuje podatke tako za vtok, kot tudi iztok določene čistilne naprave.

Relativna estrogenska aktivnost posameznega vzorca je prikazana z grafikoni na slikah od 8 do 14. Vsaka slika predstavlja REA vrednosti posebej za vtok oziroma iztok določene čistilne naprave. Izjema je le slika 10, kjer so rezultati tako vtoka kot tudi iztoka čistilne naprave B prikazani na istem grafikonu.

4.1 ZAVIRANJE RASTI KVASOVK

Precej močno zaviranje rasti kvasovk smo zaznali v vzorcu vtoka čistilne naprave A (preglednica 3) vse do nekoncentriranih variant vzorca. Po dodatnem čiščenju s silikagelom se je prisotnost strupenih snovi očitno zmanjšala, saj smo zaznali zaviranje rasti kvasovk le pri najvišjem koncentratu.

Iztok čistilne naprave A (preglednica 3) ni bil strupen za kvasovke tudi pri najbolj koncentriranih variantah vzorca.

Preglednica 3: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (A1) in iztoka (A2) čistilne naprave A

Koncentrat [x]	Vzorec A1	Vzorec A1 - SG	Vzorec A1 - DK	Vzorec A1 – DK+SG
12,5	74,1±4,8	30,1±22,7	0	0
6,3	65,9±4,8	0	0	0
3,1	56,3±8,4	0	0	0
1,6	74,1±10,9	0	0	0
0,8*	68,1±10,5	0	0	0
0,4*	0	0	0	0
Koncentrat [x]	Vzorec A2	Vzorec A2 - SG	Vzorec A2 - DK	Vzorec A2 – DK+SG
12,5	0	0	0	0
6,3	0	0	0	0
3,1	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,8*	0	0	0	0
0,4*	0	0	0	0

* Koncentracijske vrednosti, ki so manjše od 1x, predstavljajo redčitve originalnega vzorca.

V primeru čistilne naprave B (preglednica 4) smo zaviranje rasti kvasovk zaznali le v vzorcu vtoka pri najvišjih dveh koncentratih. Po nadaljnjih postopkih (čiščenje s silikagelom, dekonjugacija) vpliva na rast kvasovk nismo zaznali. Prav tako nismo zaznali vpliva vzorca iztoka čistilne naprave B na rast kvasovk.

Preglednica 4: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (B1) in iztoka (B2) čistilne naprave B

Koncentrat [x]	Vzorec B1	Vzorec B1 - SG	Vzorec B1 - DK	Vzorec B1 – DK+SG
12,5	80,8±12,5	0	0	0
6,3	49,4±8,1	0	0	0
3,1	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
Koncentrat [x]	Vzorec B2	Vzorec B2 - SG	Vzorec B2 - DK	Vzorec B2 – DK+SG
12,5	0	0	0	0
6,3	0	0	0	0
3,1	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0

Ob izpostavitvi kvasovk koncentratom vzorcev vtoka in iztoka čistilne naprave C (preglednica 5) smo opazili, da so bili strupeni le prvi trije najvišji koncentraciji vtoka. Po postopku čiščenja na silikagel kolonah in/ali postopku dekonjugacije, zaviranja rasti nismo zaznali niti pri najvišjih koncentracijah. Prav tako nismo zaznali nobenega vpliva vzorca iztoka na rast kvasovk.

Preglednica 5: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (C1) in iztoka (C2) čistilne naprave C

Koncentrat [x]	Vzorec C1	Vzorec C1 - SG	Vzorec C1 - DK	Vzorec C1 – DK+SG
12,5	78,0±3,2	0	0	0
6,3	67,3±8,6	0	0	0
3,1	36,3±12,7	0	0	0
1,6	0	0	0	0
Koncentrat [x]	Vzorec C2	Vzorec C2 - SG	Vzorec C2 - DK	Vzorec C2 – DK+SG
12,5	0	0	0	0
6,3	0	0	0	0
3,1	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0

Zaviranje rasti kvasovk smo zaznali pri vseh postopkih obdelave tako vtoka kot iztoka vzorca D (preglednica 6), razen pri kombinaciji obdelave vzorca s silikagelom in dekonjugacijo. Zaviranje rasti se zmanjšuje s številom opravljenih čiščenj, po dvakratnem čiščenju na silikagel kolonah smo opazili občutno zmanjšanje zaviranja rasti kvasovk, prav tako tudi po opravljenem čiščenju na silikagelu v kombinaciji s postopkom dekonjugacije.

V obeh primerih le najvišji koncentrat vzorca tako vtoka, kakor tudi iztoka zavira rast kvasovk. V vseh primerih ni opazne razlike med vzorcem vtoka in iztoka .

Preglednica 6: Zaviranje rasti kvasovk [%] za vzorec vtoka (D1) in iztoka (D2) čistilne naprave D

Koncentrat [x]	Vzorec D1	Vzorec D1 - SG	Vzorec D1 – 2x SG	Vzorec D1 - DK	Vzorec D1 – DK+SG
6,3	73,9±3,0	88,9±1,0	46,9±6,7	37,8±24,3	0
3,1	51,6±10,4	54,2±9,24	0	0	0
1,6	56,6±10,5	0	0	0	0
0,8*	51,7±26,0	0	0	0	0
0,4*	0	0	0	0	0
Koncentrat [x]	Vzorec D2	Vzorec D2 - SG	Vzorec D2 – 2x SG	Vzorec D2 - DK	Vzorec D2 – DK+SG
6,3	78,8±4,9	72,8±11,0	65,2±13,5	45,9±20,7	0
3,1	79,8±2,4	37,1±8,5	0	0	0
1,6	70,3±13,8	0	0	0	0
0,8*	0	0	0	0	0
0,4*	0	0	0	0	0

* Koncentracijske vrednosti, ki so manjše od 1x, predstavljajo že redčene vrednosti originalnega vzorca.

4.2 RELATIVNA ESTROGENSKA AKTIVNOST (REA)

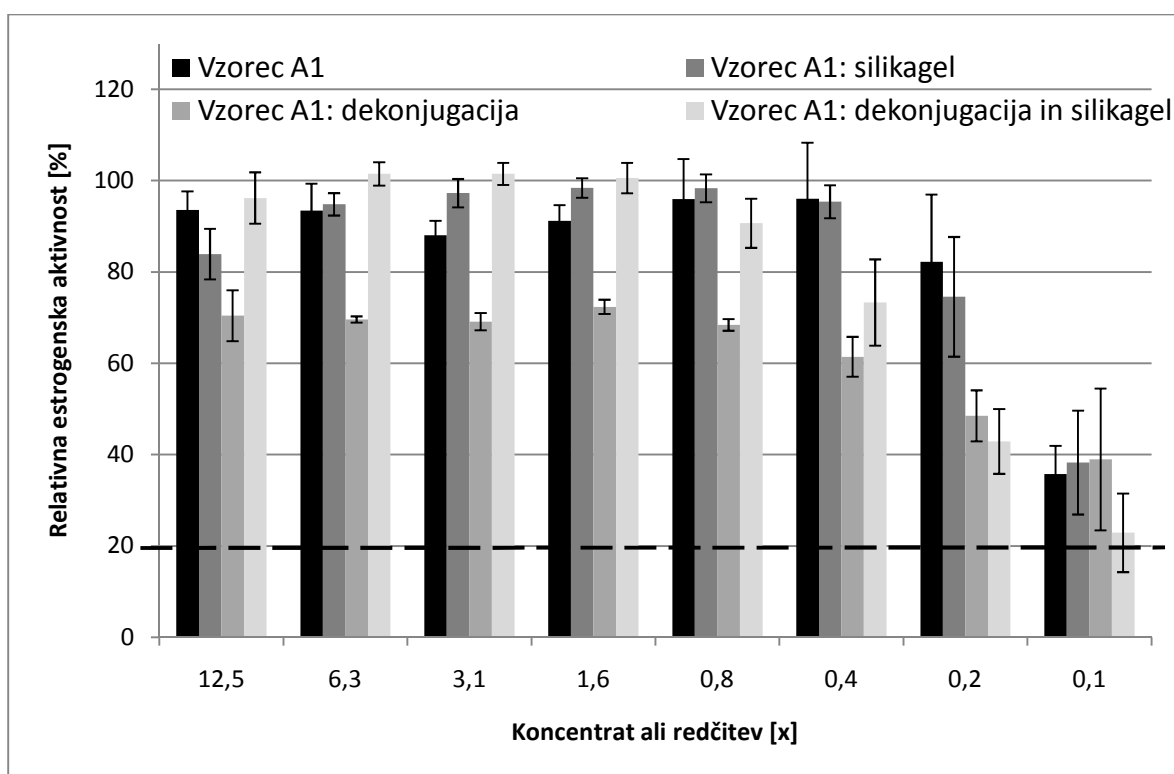
Kadar govorimo o relativni estrogenski aktivnosti primerjamo estrogensko aktivnost vzorca glede na estrogensko aktivnost naravnega estrogenega hormona 17 β -estradiola. Če ima npr. v našem primeru vzorec približno 100 % REA, to pomeni, da je v njem mešanica snovi, ki povzročajo vsaj približno takšno estrogenost, kakor bi jo 1,36 μ g/l čistega E2, če ne celo večje.

Prag estrogenske aktivnosti smo izbrali pri 20 % na osnovi upoštevanja napak meritev in praktičnih izkušenj, kar je na grafikonih relativne estrogenske aktivnosti (slike 8 – 14) prikazano kot črtkana črta pri REA 20 %.

Na abscisi grafikonov relativne estrogenske aktivnosti (slike 8 – 14) predstavljajo vrednosti od 12,5 do 1,6 koncentrate originalnega vzorca, vrednosti od 0,8 do 0,1 pa redčitve originalnega vzorca. Po koncentriranju vzorcev smo v mikrotitrski plošči namreč naredili redčitveno vrsto in tako prišli do redčitve originalnega vzorca.

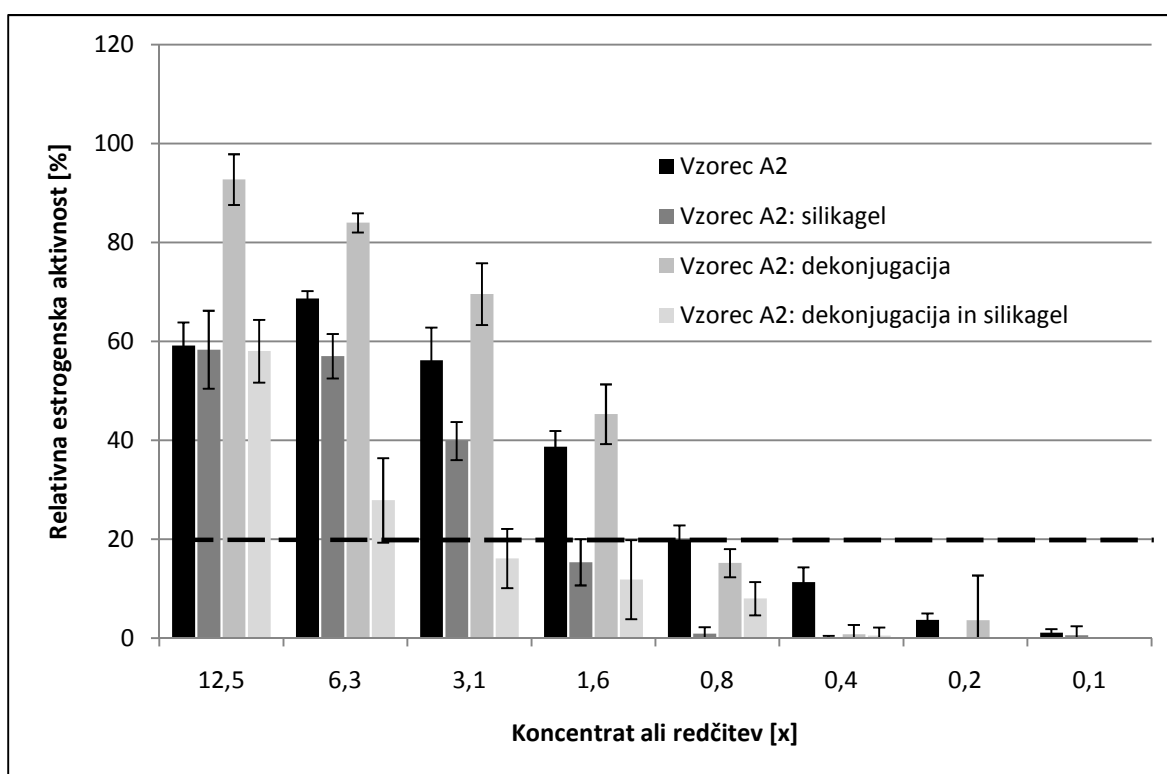
4.2.1 Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave A

Estrogenska aktivnost se z redčenjem koncentratov odpadne vode A1 ne zmanjšuje (slika 8), kar velja tudi za vse kombinacije dodatnih obdelav vzorca (silikagel, dekonjugacija in silikon + dekonjugacija). Zmanjšanje estrogenske aktivnosti zaznamo šele po redčitvah originalnega vzorca (0,4 x – 0,1 x). Medtem ko se EA vzorca A1 pred in po silikonu ne razlikuje, opazimo zmanjšanje EA tako po dekonjugaciji kot po kombinaciji silikonu in dekonjugacije. Razliko lahko pripišemo izgubam med postoki čiščenja, saj vemo, da so izgube med postopkom SPE ekstrakcije tudi do 20 % (Stegić, 2009).



Slika 8: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave A – vtok, s standardno deviacijo

Najvišjo vrednost EA na iztoku smo ugotovili po dekonjugaciji vzorca A2. Opazimo tudi zmanjševanje EA z redčenjem koncentratov vzorca A2 (slika 9). Pri minimalno koncentriranem (1,6 x) vzorcu je po dekonjugaciji REA vrednost še vedno dokaj visoka- $45,3 \pm 6,0$ %.



Slika 9: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave A – iztok, s standardno deviacijo

Glede na to, da se REA vrednosti vzorcev vtoka čistilne naprave A z redčenjem koncentratov ne nižajo, ampak se gibljejo okrog iste vrednosti, nas je zanimalo, če je mogoče vzrok za tako visoko estrogenost še kaj drugega, kot samo estrogeni (lažni pozitivni rezultati).

Najprej smo ponovili YES test z vzorcem A1 in dobili podobne rezultate kakor prej. Nato smo na ploščo, kjer smo izvedli redčitev vzorca A1, nanesli samo rastno gojišče s CPRG, brez kvasovk. S tem smo preverjali, če kakšna v vzorcu prisotna snov reagira s CPRG. Test je bil negativen.

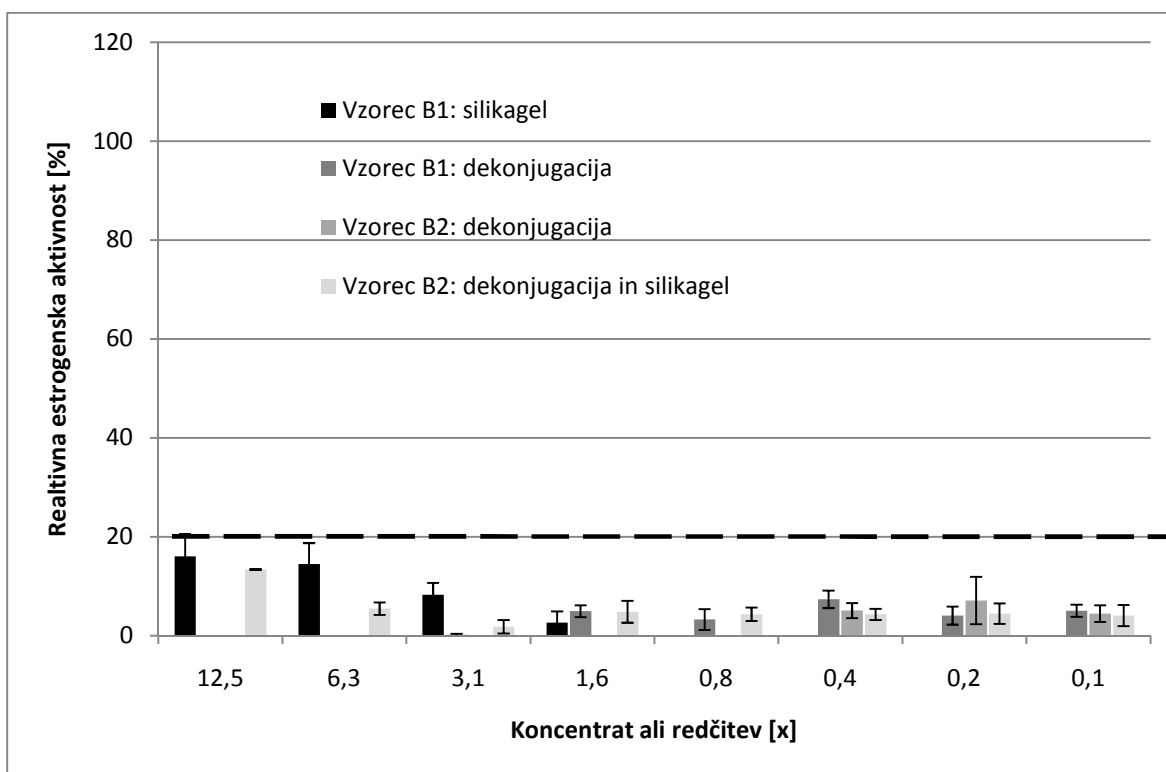
Nato smo naredili lizo kvasnih celic (koncentrirana kultura v primerjavi s tisto, ki se nanaša v standardnem YES testu) in nanesli redčitve lizata v ultra čisti vodi (miliQ) skupaj s CPRG na prazno mikrotitrsko ploščo. S tem smo preverjali, če vsebina celic reagira s CPRG. YES test je bil negativen in prav tako kontrolne agarne plošče.

Nazadnje smo na ploščo, kjer smo izvedli redčitev vzorca A1, nanесли še lizat v miliQ s CPRG, da bi preverili, če mogoče nastanejo kompleksi med komponentami celice in nečistočami v vzorcu, ki reagirajo s CPRG. Test je bil negativen.

Z negativnimi rezultati zgoraj omenjene serije testov smo dokazali, da so v vzorcu A1 prisotni estrogeni in ksenoestrogeni dejansko tisti, ki so odgovorni za visoko REA.

4.2.2 Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave B

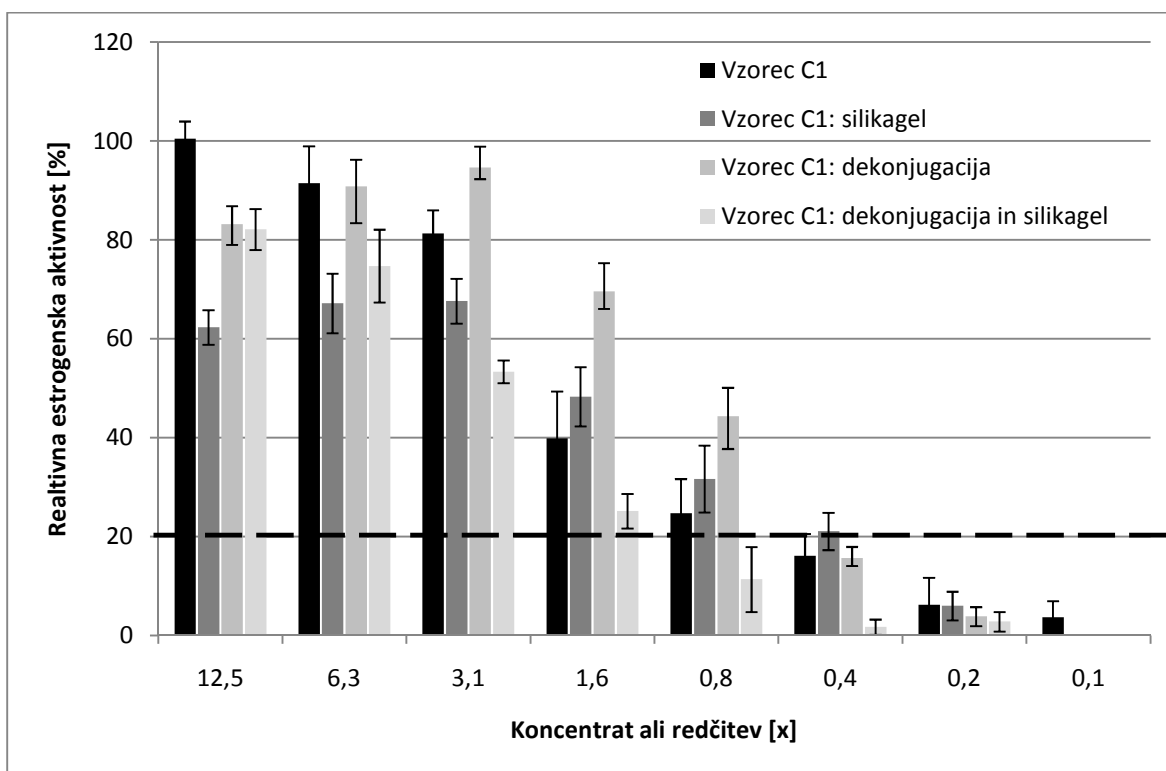
Niti na dotoku niti na iztoku čistilne naprave B (slika 10) nismo zaznali estrogenske aktivnosti.



Slika 10: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave B – vtok in iztok, s standardno deviacijo B1 – vtok; B2 - iztok

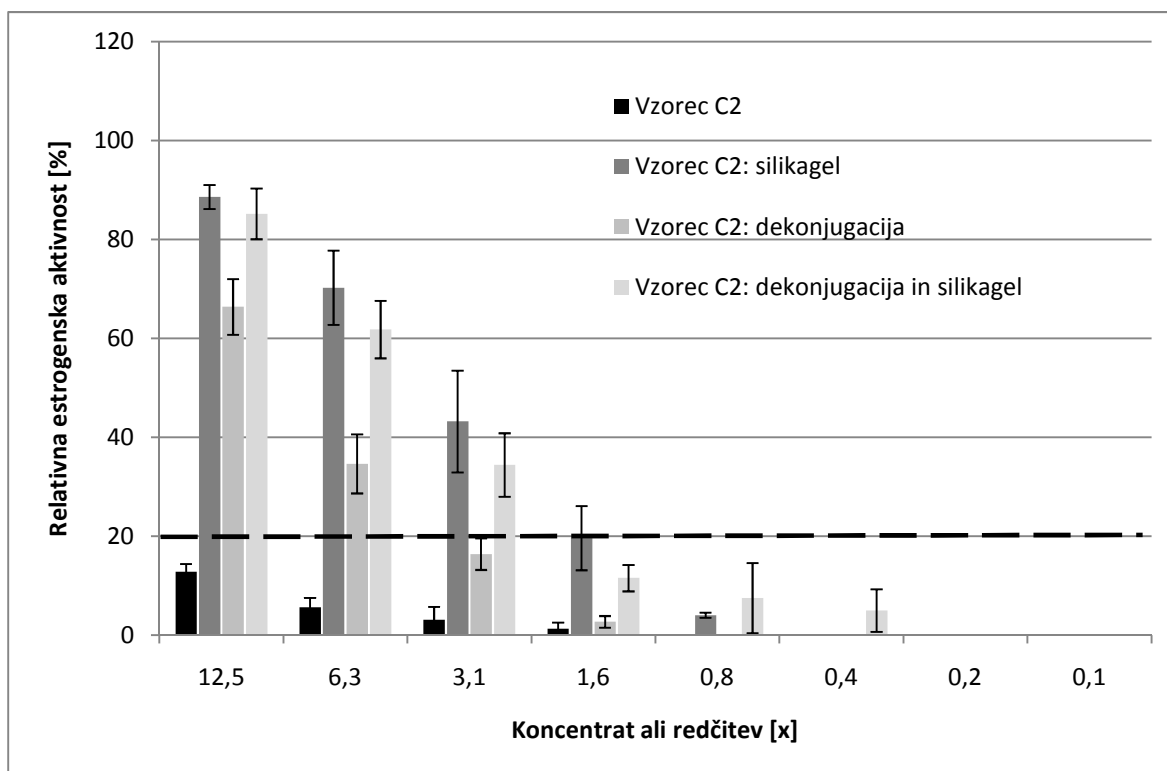
4.2.3 Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave C

Najvišja vrednost REA na vtoku v čistilno napravo C (slika 11) smo zaznali po dekonjugaciji vzorca C1 ($94,6 \pm 4,3$ %, pri 3,1 x koncentratu vzorca C1), iz česar sklepamo na prisotnost nekonjugiranih estrogenov na vtoku čistilne naprave C. Pri minimalno redčenem originalnem (0,8 x) vzorcu C1 smo še vedno zaznali EA .



Slika 11: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave C – vtok, s standardno deviacijo

Na iztoku iz čistilne naprave C (slika 12) smo najvišjo REA vrednost zaznali pri vzorcu po čiščenju na silikagelu oz. vzorcu po čiščenju na silikagelu in dekonjugaciji. Pri izhodiščnem vzorcu iztoka kljub odsotnosti inhibicije nismo zaznali estrogenske aktivnosti.

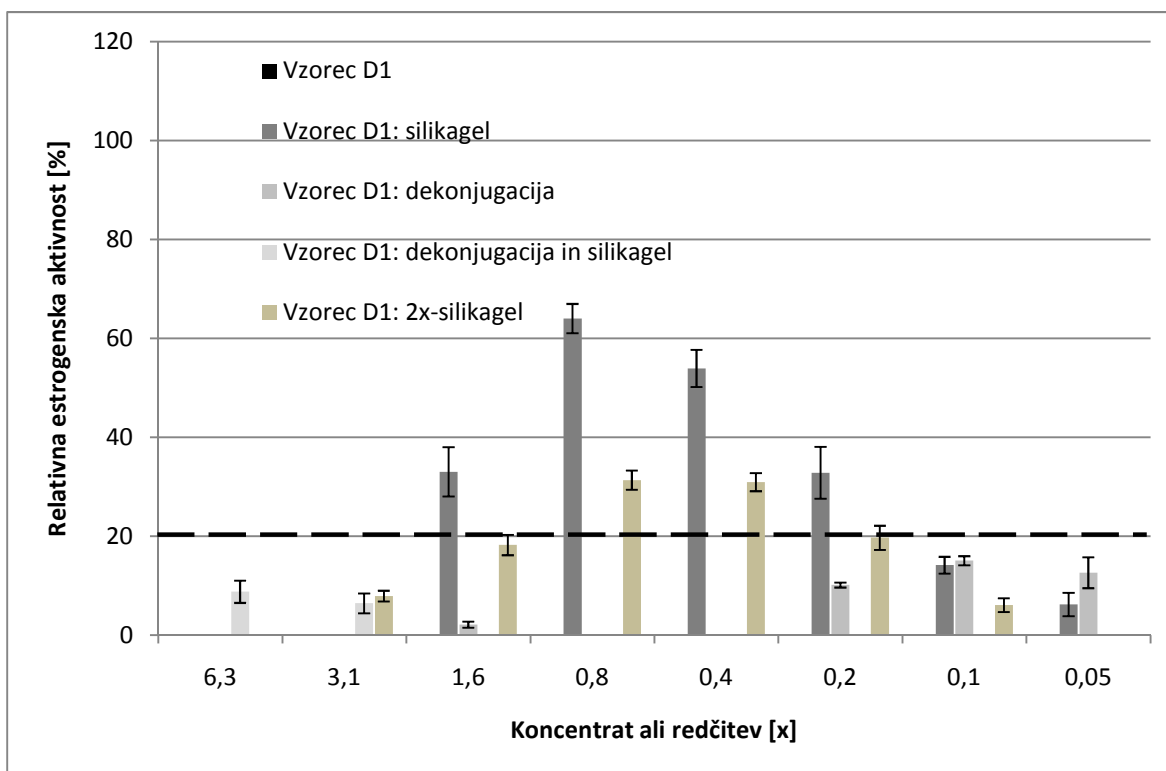


Slika 12: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave C – iztok, s standardno deviacijo

4.2.4 Relativna estrogenska aktivnost za vtok in iztok čistilne naprave D

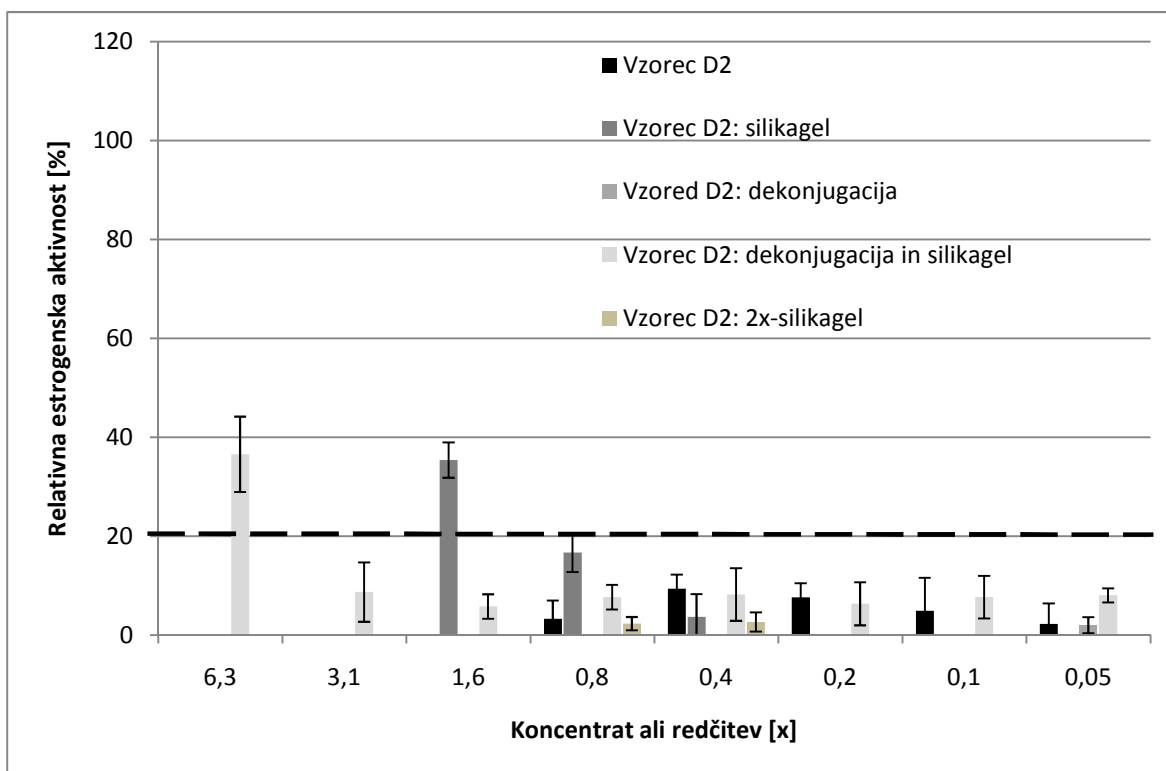
Zaradi močne onesnaženosti vzorca D smo poleg 1 x čiščenja s silikagelom izvedli še 2 x (zaporedno) čiščenje s silikagelom.

Na vtoku čistilne naprave D (slika 13) je bila najvišja vrednost REA ($64,0 \pm 3,0$ %) po čiščenju vzorca na silikagelu pri redčitvi 0,8 x (slika 14). Opazimo tudi, da je EA vzorca D1 po čiščenju s silikagelom pri koncentratu 1,6 x manjša kakor pri koncentratu 0,8 x (ki je hkrati tudi že redčitev originalnega vzorca), kar lahko pripišemo vplivu zaviranja rasti kvasovk, ki v primeru 1,6 x koncentrata D2 znaša 70,3 %, medtem ko zaviranja rasti pri 0,8 x koncentratu nismo opazili.



Slika 13: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave D – vtok, s standardno deviacijo

V iztoku D2 (slika 14) smo določili najvišjo REA vrednost po čiščenju vzorca na silikagelu (1,6 x koncentrat) ter po kombinaciji čiščenja na silikagelu in dekonjugaciji (že pri 6,3 x koncentratu).



Slika 14: Relativna estrogenska aktivnost za vzorec čistilne naprave D – iztok, s standardno deviacijo

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE A

Na čistilno napravo A dotekajo komunalne odpadne vode in padavinske vode. Povprečni dnevni pretok je približno 4500 m³/dan. Zadrževalni čas je 24 ur in obremenitev po KPK 982 mg_{KPK}/m³.

Ker čistilna naprava sprejema v veliki večini le komunalne odpadne vode (12 vol. % predstavljajo odpadne vode iz avtomobilske industrije in manj kot 1 % farmacevtske ind.), nismo pričakovali tako visokega zaviranja rasti kvasovk na vtoku (74,1 %). Precej visoko (68 %) zaviranje rasti kvasovk smo zaznali tudi še v rahlo redčenem vzorcu (0,8x) vtoka. Vsak nov dodaten vir odpadne vode na čistilno napravo povzroči tudi redčenje. Tako je, v primeru komunalne vode ČN A, redčenje odvisno od pritoka padavinskih vod, ki ni konstanten in se zato lahko zgodi, da je vtok bolj koncentriran in zato tudi bolj strupen. Po dodatnem čiščenju s silikagelom smo zaviranje rasti zaznali samo pri najvišjem koncentratu vzorca A, vendar je bilo to bistveno manjše od originalnega vzorca. Na iztoku nismo zaznali zaviranja rasti, kar pomeni, da čistilna naprava učinkovito odstranjuje snovi, ki povzročijo zaviranje rasti kvasovk. Originalni vzorci vtoka po dekonjugaciji prav tako niso kazali zaviranja rasti, saj smo dekonjugirane vzorce še enkrat spustili skozi SPE kolone, ki so dodatno odstranile strupene snovi.

Ugotovili smo, da je dodatno čiščenje s silikagelom učinkovito zmanjšalo prisotnost strupenih snovi v vzorcu **vtoka**, saj smo po tem postopku lahko določili estrogensko aktivnost v koncentratih. REA je bila v višjih koncentratih v območju med 90 in 100 %, trend padanja vrednosti REA pa se vidi šele pri zelo redčenih vzorcih (0,4 - 0,1 x). Vzrok tako visoke REA in neupada le-te z redčenjem koncentratov lahko pripišemo nasičenju estrogenskega receptorja. V primeru izredno velike količine estrogensko aktivnih spojin v vzorcu zaradi nasičenosti estrogenskega receptorja ne moremo zaznati razlik v estrogenski aktivnosti med posameznimi koncentratih vzorca.

Ker smo pri različno koncentriranih vzorcih dobili enake rezultate, smo najprej preverili, če so visoko REA povzročili lažni pozitivni rezultati. Kvasne celice ob lizi sprostitjo razne

encime in druge celične komponente, ki bi lahko oksidirale hormonske motilce ali CPRG, kar bi dalo pozitivno reakcijo. Enako bi se lahko zgodilo s strupenimi snovmi v vzorcu. Ena izmed možnosti je tudi vezava celičnih komponent v komplekse s strupenimi snovmi v vzorcu, ki bi reagirali s CPRG. Vsi rezultati YES testov, s katerimi smo te možnosti preverjali, so bili negativni in s tem smo ovrgli možnost lažnih pozitivnih rezultatov ter tako potrdili prisotnost estrogenov in ksenoestrogenov v testiranih vzorcih.

Pri vtoku čistilne naprave A se je za najboljšo kombinacijo metod, ki dajo najvišje vrednosti REA, izkazala kombinacija dodatnega čiščenja s silikagelom skupaj z dekonjugacijo ali pa dodatno čiščenje s silikagelom brez dekonjugacije, saj bistvene razlike ni bilo. Dekonjugirani vzorci so pokazali vidno nižje vrednosti REA od ostalih vzorcev, vključno z originalnim. Iz tega lahko sklepamo, da so bili v vzorcih vtoka v večini prisotni ksenoestrogeni in že dekonjugirani estrogeni, nižje REA vrednosti pa so najverjetneje posledica izgub estrogenov in ksenoestrogenov med postopki koncentriranja in čiščenja.

Iz dobljenih rezultatov vtoka čistilne naprave A lahko trdimo, da so bile v vzorcu prisotne strupene snovi, ki so zavirale rast kvasovk, zato je postopek dodatnega čiščenja zelo pomemben in nujen za ustrezno dokazovanje prisotnosti estrogensko aktivnih snovi.

Na **iztoku čistilne naprave A** smo najvišjo REA (93 %) zaznali pri najvišjem koncentratu (12,5 x) in sicer v dekonjugiranem vzorcu. Pri redčenih vzorcih iztoka nismo zaznali estrogenske aktivnosti.

Glede na to, da so vrednosti REA po dekonjugaciji bistveno višje (Slika 9) od ostalih, lahko sklepamo, da so v iztoku prisotni konjugirani naravni estrogeni in/ali EE2. Encim namreč nima vpliva na ksenoestrogene, saj ti niso konjugirani. D'Ascenzo s sod. (2002) je z laboratorijskim biodegradacijskim testom dokazal, da so v odpadni vodi naravni estrogeni, konjugirani s sulfatom (E-S), težje hidrolizirani kakor tisti konjugirani z glukuronidom (E-G), kar je pripisal nižji sulfatazni encimski aktivnosti v teh vodah. Bakterije v odpadni vodi potrebujejo za dekonjugacijo 50 % E-S približno 2,5 dni, to pa v primeru E-G traja le 7 ur. Vzrok za tako visok delež konjugiranih estrogenov je lahko prekratek zadrževalni čas odpadne vode na čistilni napravi, da bi se dekonjugirala večina

estrogenov, še posebej, če so ti konjugirani s sulfatom, saj so manj dovzetni za mikrobnou dekonjugacijo.

Z nadaljno analizo bi lahko preverili, katera stranska skupina je konjugirana na naravne estrogene v naših vzorcih. V iztoku bioloških čistilnih naprav z aktivnim blatom, ki sprejemajo komunalne odpadne vode, ksenoestrogeni predstavljajo navadno le 0,7 – 4 % celotne estrogenske aktivnosti (Körner in sod., 2000). Iz naših rezultatov žal ne moremo razbrati, kakšen je odstotek ksenoestrogenov oz. estrogenov, saj ne vemo, koliko je prisotnih estrogenov v prosti obliki. Če primerjamo originalni vzorec z dekonjugiranim vzorcem, vidimo, da se odstotek estrogenske aktivnosti, ki jo povzročijo konjugirani estrogene, giblje med 13 in 37 %, odvisno od koncentrata. Rezultat ni presenetljiv, saj smo imeli opravka s komunalnimi odpadnimi vodami, ki bi morale vsebovati naravne estrogene. Od učinkovitosti čistilne naprave je odvisno ali iztoki vsebujejo več estrogenov v prosti obliki ali konjugirane, saj se ti v stiku z aktivnim blatom lahko hidrolizirajo, nekaj pa se jih dekonjugira že v kanalizaciji, ob prisotnosti bakterije *E. coli* v blatu.

Prav tako smo opazili, da dodatno čiščenje s silikagelom pri vzorcih iztoka bistveno ni vplivalo na REA, kar pomeni, da so se organske in strupene spojine iz vtoka med čiščenjem na čistilni napravi odstranile in zato iztok ni bil strupen za kvasovke.

V vzorcih, kjer smo uporabili kombinacijo dodatnega čiščenja na silikagelu in dekonjugacije, so bile vrednosti REA nižje v primerjavi z vrednostimi, dobljenimi v ostalih postopkih. Znižane vrednosti lahko razložimo z izgubami pri postopkih čiščenja in koncentriranju vzorca.

Zaključimo lahko, da v primeru iztoka čistilne naprave A dodatno čiščenje s silikagelom ni bilo potrebno, saj smo REA lahko določili že v vzorcih po koncentriranju in razlik med postopki ni bilo opaziti.

5.2 ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE B

Čistilna naprava B sprejema pretežno komunalne in padavinske vode, nekaj pa tudi industrijskih odpadnih voda. Povprečni dnevni pretok znaša 50.000 – 160.000 m³/dan. Zadrževalni čas odpadne vode je 15 – 22 ur in obremenitev po KPK 675 mg_{KPK}/m³.

Pričakovali smo večje zaviranje rasti kakor pri vzorcih iz čistilne naprave A, saj se v čistilno napravo B stekajo tudi industrijske odpadne vode (farmacevtska, kemijska, prehrabena, kovinarska). Zaviranje rasti kvasovk smo zaznali le v prvih dveh najvišjih koncentracijah vtoka, ko pa smo vzorec vtoka dodatno čistili s silikagelom, strupenosti najvišjih koncentracij nismo več ugotovili. Tudi v tem primeru smo s postopkom dodatnega čiščenja uspešno odstranili strupene snovi v toku. Pri vzorcih iztoka nismo zaznali zaviranja rasti kvasovk.

Tako na vtoku kakor tudi na iztoku nismo zaznali estrogenske aktivnosti pri nobenem od obdelanih vzorcev, niti v najbolj koncentriranih vzorcih.

5.3 ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE C

Na čistilno napravo C se steka mešanica komunalnih odpadnih vod, padavinskih vod in industrijskih odpadnih vod (odpadne vode iz farmacevtske, klavniške, prehrabene, tekstilne, pohištvene, kemijske in kovinskopredelovalne industrije, deponijsko izcedne vode, ...). Industrijske odpadne vode tako predstavljajo kar 37 volumskih % vtoka. Sprejemajo pa tudi greznične in posebne odpadne vode, ki jih na ČN pripeljejo s cisternami. Maksimalni dnevni pretok na čistilni napravi je 34.000 m³/dan. Obremenitev po KPK je 610 mg_{KPK}/m³.

Prav zaradi industrijskih odpadnih vod smo pričakovali prisotnost strupenih snovi ter posledično večje zaviranje rasti kvasovk kakor pri vzorcih iz čistilne naprave A in B. Zaviranje rasti je na originalnem **vtoku** čistilne naprave C primerljivo z vtokom čistilne naprave A, le da se z redčenjem vzorca strupenost prej zmanjša oz. preneha. Uporaba

postopka dodatnega čiščenja se je ponovno pokazala kot učinkovita, saj smo tudi v najvišjih koncentratih vtoka uspešno odstranili strupene snovi. Najvišjo estrogensko aktivnost (okoli 90 %) smo določili v vzorcih vtoka v prvih treh najvišjih koncentratih, z nadaljnim redčenjem pa je počasi upadala. Najvišje vrednosti estrogenske aktivnosti smo dobili na vtoku po dekonjugaciji, kar pomeni, da so prisotni naravni estrogeni in da je delež le-teh v konjugirani obliki, kar je pripomoglo k povišanju estrogenske aktivnosti po dekonjugaciji. Rezultati, pridobljeni s kombinacijo dodatnega čiščenja in dekonjugacije, so bili primerljivi z rezultati z uporabo samo dodatnega čiščenja. Pri obeh smo opazili trend padanja vrednosti estrogenske aktivnosti z redčenjem koncentratov.

Vsi različno obdelani vzorci **iztoka** iz čistilne naprave C niso kazali zaviranja rasti. Glede na to, da je čistilna naprava C znana po svoji visoki učinkovitosti, je odsotnost strupenosti v iztoku pričakovana. Kljub temu, da nismo zaznali zaviranja rasti kvasovk v originalnem vzorcu iztoka iz čistilne naprave, je bila estrogenska aktivnost pri najvišjem koncentratu pod pragom estrogenosti (20 %). Vsi različno obdelani vzorci iztoka C so pokazali visoko estrogensko aktivnost pri višjih koncentratih, ki je z redčenjem postopno upadala. Postopek dekonjugacije ni bistveno vplival na določanje estrogenske aktivnosti vzorcev, kar pomeni, da na iztoku ni bilo prisotnih konjugiranih estrogenov, temveč so prisotni prosti naravni estrogeni in/ali ksenoestrogeni.

5.4 ESTROGENSKA AKTIVNOST VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE D

Čistilna naprava D je najmanjša med omenjenimi, čemur je primeren tudi nizek dnevni pretok 250 m³/dan. Vanjo se stekajo odpadne vode iz objektov reje domačih živali, v večini gnojevka. Čistilna naprava se od ostalih treh razlikuje tudi po svojem obratovanju, saj ne uporablja aeracijskih bazenov z aktivnim blatom, temveč anaerobne bioreaktorje s popolnim mešanjem, kjer proizvajajo bioplin in organsko gnojilo. Zadrževalni čas gnojevke v teh gniliščih je 10 - 30 dni.

Za vzorce iz čistilne naprave D smo zaradi njihove intenzivne onesnaženosti pričakovali največje zaviranje rasti kvasovk, kar se je tudi zgodilo. Vzorci vtoka in iztoka so edini od

vseh preiskovanih, ki so pri najvišjem koncentratu zavirali rast tudi po vseh postopkih, razen po dodatnem čiščenju s silikagelom z dekonjugacijo. V strupenosti originalnih vzorcev vtoka in iztoka nismo zaznali bistvenih razlik v zaviranju rasti kvasovk. Dodatno čiščenje s silikagelom ni imelo učinka pri najvišjih koncentratih, saj so strupene snovi še vedno preveč koncentrirane, zato relativne estrogenske aktivnosti nismo mogli določiti. Zaviranje rasti po dodatnem čiščenju s silikagelom je prenehalo prej kakor pri vzorcih brez čiščenja. Odstotek zaviranja rasti pri nečiščenih vzorcih ostaja pri vseh koncentratih, razen najvišjega, enak. Da bi še bolj zmanjšali zaviranje rasti kvasovk, smo vzorec vtoka in iztoka 2 x spustili skozi silikagel kolone in opazili, da je bil učinek boljši.

Razen v primeru čistilne naprave D smo na vtokih drugih čistilnih naprav zaznali večje zaviranje rasti kakor na iztokih, kjer zaviranja rasti v večini primerov sploh ni bilo. Dodatno čiščenje s silikagelom se je v vzorcih iz teh treh čistilnih naprav izkazalo kot učinkovita metoda, saj tudi pri najvišjih koncentratih ni bilo zaviranja rasti, pri čistilni napravi D pa je strupenost prenehala prej.

Najvišjo relativno estrogensko aktivnost (64 %) smo na **vtoku** ČN D zaznali pri rahlo redčenem vzorcu (0,8 x) po dodatnem čiščenju na silikagelskih kolonah. Hkrati se je lepo pokazal vpliv zaviranja rasti kvasovk na določitev estrogenske aktivnosti. V primeru 1,6 x koncentrata smo zaznali $22,9 \pm 4,0$ % zaviranje rasti in relativno estrogensko aktivnost 33 % (v preglednici 7 ni prikazano), medtem ko smo pri nižjem 0,8 x koncentratu, kjer ni bilo zaviranja rasti kvasovk, določili 64 % REA. Na sliki 13 vidimo, da pri dodatnem čiščenju s silikagelom prihaja do izgub, saj so razlike med enkratnim in dvakratnim čiščenjem na silikagelu očitne.

Tudi v primeru vtoka vzorca D se je dodatno čiščenje s silikagelom izkazalo kot učinkovita metoda, s katero lahko zaznamo estrogensko aktivnost v YES testu. Dekonjugacija ni imela pozitivnega vpliva na zaznavanje estrogenske aktivnosti, saj so bili dekonjugirani vzorci, podvrženi dodatnemu čiščenju, še vedno pod mejo zaznave REA.

Eden izmed možnih razlogov za nizko REA vrednost bi lahko bila adsorbcija estrogenov na koloidne delce, ki smo se jih znebili s filtriranjem. Zhao in sod. (2010) so namreč v

svoji raziskavi določanja estrogenov v gnojevki večino estrogenske aktivnosti (90 %) zaznali na delcih, ki so se ujeli na 0,7 – 1,2 μm filtre in ne v vodni fazi.

Na **iztoku** smo zaradi visokega zaviranja rasti kvasovk zaznali REA samo v primeru 6,3 x koncentrata po dodatnem čiščenju in dekonjugaciji (37 %) ter 1,6 x koncentrata po dodatnem čiščenju (35 %).

Celoten postopek določanja EA, ki vključuje metode koncentriranja s SPE ter čiščenje na silikagelu in/ali dekonjugacijo, ni bil najbolj primeren za vzorce odpadnih vod iz objektov koncentrirane reje domačih živali. Dodatno čiščenje vzorca s silikagelom ni bilo zadostno, večkratno čiščenje pa je vodilo do večjih izgub estrogenov in ksenoestrogenov. Podobno sta v svoji raziskavi ugotovila tudi Yang in Cicek (2008), ki poročata, da so bile izgube estrogenov pri tekočinski ekstrakciji s cikloheksanom tudi do 26 %.

5.5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko podamo naslednje sklepe:

- zaviranje rasti kvasovk je bilo večje na vtokih na čistilne naprave kakor na iztokih iz čistilnih naprav. Izjema je čistilna naprava D, kjer je bil iztok enako strupen kakor vtok.
- Po dodatnem čiščenju s silikagelom smo pri vtokih dosegli zmanjšanje ali celo prenehanje zaviranja rasti kvasovk, kot tudi povišanje estrogenske aktivnosti, kar pomeni, da je bilo dodatno čiščenje s silikagelom učinkovito.
- V primeru, da po dekonjugaciji dobimo višje vrednosti estrogenske aktivnosti lahko trdimo, da so v vzorcu prisotni konjugirani naravni in/ali sintetični estrogeni.
- Kadar imamo vzorce z nizko vsebnostjo snovi z estrogensko aktivnostjo (redčitve), so izgube tekom dodatnega čiščenja bolj očitne in bolj vplivajo na rezultate.

- Dvakratno dodatno čiščenje ne pripomore k zaznavanju višje estrogenske aktivnosti, temveč povzroči celo zmanjšanje estrogenosti, verjetno zaradi izgub med postopkom čiščenja.
- Z uporabo kombinacije dodatnega čiščenja s silikagelom in dekonjugacije ne dobimo vedno najvišje vrednosti estrogenske aktivnosti, še posebej pri nižjih koncentracijah (redčitvah), saj med samimi postopki prihaja do izgub spojin z estrogenim delovanjem.
- V nekaterih primerih je prišlo po dekonjugaciji do povišanja relativne estrogenske aktivnosti, s čimer smo potrdili prisotnost naravnih estrogenov ter EE2, hkrati pa dokazali, da je delež le-teh tudi v neaktivni obliki.
- Največjo relativno estrogensko aktivnost smo določili na vtoku in iztoku iz čistilne naprave A, v katero se stekajo komunalne vode, zato lahko predvidevamo, da EA na čistilni napravi A povzročajo (kseno)estrogeni iz gospodinjstev.
- Na vtoku in iztoku čistilne naprave B nismo zaznali estrogenske aktivnosti v testiranih vzorcih.

Glede na rezultate lahko:

- potrdimo hipotezo, da je na vtokih na čistilno napravo estrogenska aktivnost večja kot na iztokih
- potrdimo hipotezo, da prisotnost številnih strupenih snovi v vtokih in iztokih zavira rast kvasovk in tako onemogoči določanje estrogenske aktivnosti
- potrdimo hipotezo, da po odstranitvi strupenih snovi s silikagelom, kvasovke rastejo normalno, kar nam omogoči določanje estrogenske aktivnosti vzorcev
- zavrnilo hipotezo, da po postopku dekonjugacije v vseh primerih zaznamo večjo estrogensko aktivnost, saj je postopek dekonjugacije odvisen od prisotnosti naravnih estrogenov, ne pa ksenoestrogenov.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo zaključili, da dodatno čiščenje s silikagelom in/ali postopek dekonjugacije večinoma pripomoreta k zaznavanju celokupne estrogenske aktivnosti z YES testom, in sicer v odpadnih vodah čistilnih naprav, kamor priteka komunalna voda, ne pa v odpadni vodi iz objektov reje domačih živali.

V prihodnjih raziskavah bi bilo potrebno oceniti dejanske izgube spojin z estrogenim delovanjem v postopkih dodatnega čiščenja s silikagelom ter v postopku dekonjugacije (ponovna SPE ekstrakcija). Smiselno bi bilo preveriti tudi uporabnost YES testa (Balsiger in sod., 2010), ki je bolj občutljiv od obstoječega in zato ni potrebna ekstrakcija ali koncentriranje vodnih vzorcev.

6 POVZETEK

V skupino hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem sodijo naravni in sintetični hormoni, fito- in miko-estrogeni, ter obsežna skupina industrijskih spojin, ki ji pravimo ksenoestrogeni. S svojim delovanjem lahko ovirajo sintezo, izločanje, transport, vezavo, delovanje ali odstranitev naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za ohranjanje homeostaze, reprodukcijo, razvoj in/ali obnašanje.

Vodno okolje je še posebej dovzetno za onesnaženje, saj v reke, jezera in morje preko čistilnih naprav in industrije (ne)namerno izpuščamo odpadne vode. Naravni in sintetični estrogeni delujejo že pri zelo nizkih koncentracijah (ng/l), medtem ko je večina ostalih spojin z estrogenim delovanjem biološko aktivna pri koncentracijah v območju $\mu\text{g/l}$ – mg/l .

Največje tveganje za okolje predstavljajo E1, E2, EE2 in 4-NP, saj imajo najvišjo estrogensko aktivnost, so obstojne v okolju, poleg tega pa se 4-NP v organizmih še bioakumulira. Problemi nastanejo predvsem v poletnem času, ko lahko imajo reke zaradi suše nižji pretok vode in je posledično koncentracija estrogenov v vodah večja. Biološke čistilne naprave (BČN) z aktivnim blatom, v katerih potekajo aerobni procesi, so najbolj učinkovite pri odstranjevanju teh spojin. Glavna procesa odstranjevanja pa sta adsorpcija na aktivno blato in biodegradacija.

Kadar želimo dobiti vpogled v delovanje hormonskih motilcev na organizem, uporabljamo *in vivo* biološke metode. Za ugotavljanje morebitne prisotnosti estrogensko aktivnih spojin v vodnih vzorcih, pa so zelo uporabne *in vitro* metode, saj so cenejše in hitrejše. Za določanje konkretnih spojin z estrogenim delovanjem uporabljamo kemijske metode.

V preteklih raziskavah se je pokazalo, da prisotne strupene snovi v vzorcih onemogočajo določanje estrogenske aktivnosti v vzorcih, zato smo na vzorcih najprej izvedli predčiščenje (filtracija) in jih nato koncentrirali s postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE). V koncentriranih vzorcih smo ugotavljali estrogensko aktivnost z biološkim testom YES, kjer smo uporabili gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. V preostalem vzorcu smo z uporabo kolon na osnovi silikagela odstranili snovi,

ki zavirajo rast kvasovk. Podatki kažejo, da so estrogeni prisotni tudi v konjugirani obliki in je tako njihova estrogenost prikrita, zato smo na čiščenih in nečiščenih vzorcih izvedli dekonjugacijo z encimom β -glukuronidaza. Tudi v teh vzorcih smo preverjali estrogensko aktivnost z YES testom.

Rezultati so pokazali, da je bilo zaviranje rasti na vtokih čistilnih naprav večje kakor na iztokih, kar smo tudi pričakovali. Z dodatnim čiščenjem vzorcev s silikagelom smo dosegli odsotnost zaviranja rasti kvasovk, na vtokih tudi povišanje estrogenske aktivnosti, kar pomeni, da je bilo dodatno čiščenje na kolonah učinkovito. Po dekonjugaciji se je estrogenska aktivnost povečala na vtokih, pri iztoku pa le pri eni čistilni napravi, iz česar sledi, da večina testiranih iztokov iz čistilnih naprav vsebuje estrogene v aktivni obliki.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da čiščenje s silikagelom in/ali postopek dekonjugacije pripomoreta k zaznavanju dejanske estrogenske aktivnosti z YES testom, in sicer v odpadnih vodah čistilnih naprav, kamor priteka komunalna voda, ne pa v odpadni vodi iz objektov reje domačih živali.

7 VIRI

- Adlercreutz H., Jarvenpaa P. 1982. Assay of estrogens in human feces. *Journal of Steroid Biochemistry*, 17: 639–645.
- Allner B., Stahlschmidt-Allner P., Römbke J., Knacker T. 1997. Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 4, 3: 155–162.
- Andersen H.R., Hansen M., Kjolholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T., Halling-Sorensen B. 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere*, 61: 139–146.
- Andersson A.M., Andersen H.R., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N. A., Bjerregaard P., Christiansen L. B., Gissel B., Hummel R., Bonefeld Jørgensen E., Korsgaard B, Le Guevel R., Leffers H., McLachlan J., Møller A., Nielsen J. B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K. L., Perez P., Skakkebeck N. E., Sonnenschein C., Soto A. M., Sumpter J. P., Thorpe S. M., Grandjean P. 1999. Comparison of short-term strogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107: 89–108.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C.D., Surampalli R.Y. 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41: 525–539.
- Balsiger H.A., de la Torre R., Lee W.Y., Cox M.B. 2010. A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Science of the Total Environment*, 408: 1422–1429.
- Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology*, 34, 24: 5059–5066.
- Bolčič Tavčar M., Perharič L. 2010. Škodljivost bisfenola A. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 4 str.
http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=76&pi=3&_3_id=358&_3_PageIndex=2&_3_groupId=225&_3_newsCategory=&_3_action>ShowNewsFull&pl=76-3.0. (julij, 2010).
- Carr B.R., Griffin J.E. 1998. Fertility controls and its complications. V: Williams textbook of endocrinology. 11th ed. Wilson J.D., Foester D.W., Kronenberg H.M., Reed L.P.

- (eds.). Philadelphia, W.B. Sanders Company: 901-925.
- Cooper G.M., Hausman R.E. 2004. *The cell: A molecular approach*, 3rd ed. Washington, ASM Press: 634-635.
- D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, 302, 1-3: 199–209.
- De Boever P., Demare W., Vanderperren E., Cooreman K., Bossier P., Verstraete W. 2001. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. *Environmental Health Perspective*, 109: 691-697.
- Decision No 2455/2001/EC of the European parliament and the council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. 2001. *Official Journal of European Communities*, 44, L 331: 1-5.
- Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environmental Science and Technology*, 32, 11: 1549-1558
- Des Mes T.Z.D., Kujawa-Roeleveld K., Zeeman G., Lettinga G. 2008. Anaerobic biodegradation of estrogens - hard to digest. *Water Science and Technology*, 57, 8: 1177–1182.
- Donova M.V., Egorova O.V., Nikolayeva V.M. 2005. Steroid 17 beta-reduction by microorganisms-a review. *Process Biochemistry*, 40: 2253–2262.
- Dray J., Dray F., Tiller F., Ulman A. 1972. Hydrolysis of urine metabolites of different steroid hormones by β -glucuronidase from *Escherichia coli*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 123: 853–857.
- Eertmans F., Dhooge W., Stuyvaert S., Comhaire F. 2003. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro*, 17: 515–524.
- Erb R.E., Chew B.P., Keller H.F. 1977. Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and bold, and excretion of estrogen in urine. *Journal of Animal Science*, 46: 617–626.

- Falconer I.R., Chapman H.F., Moore M.R., Ranmuthugala G. 2006. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environmental Toxicology*, 21, 2: 181–191.
- Fink-Gremmels J., Malekinejad H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenon. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 326-341.
- Fuerhacker M., Schart S., Pichler W., Ertl T., Haberl R. 2001. Sources and behaviour of bismuth active substances (BiAS) in a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment*, 227: 95-100.
- Gabet V., Miege C., Bados P., Coquery M. 2007. Analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 11: 1113–1131.
- Gaulke L.S., Strand S.E., Kalthorn T.F., Stensel H.D. 2009. Estrogen biodegradation kinetics and estrogenic activity reduction for two biological wastewater treatment methods. *Environmental Science and Technology*, 43, 18: 7111–7116.
- Howell W.M., Black D.A., Bortone S.A. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia*, 1980, 4: 676–681.
- Ibarreta D., Daxenberger A., Meyer H.H. 2001. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 109, 3: 161–184.
- Kester M.H., Bulduk S., Tibboel D., Meinel W., Glatt H., Falany C. N., Coughtrie M. W. H., Bergman A., Safe S. H., Kuiper G. G. J. M., Schuur A. G., Brouwer A., Visser T. J. 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology*, 141: 1897–1900.
- Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, 40: 1131–1142.
- Levart K. 2009. Določevanje estrogenske aktivnosti vtokov in iztokov čistilnih naprav. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 63 str.
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A. 2003. Endocrine disruptors

- in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75, 5: 631–681.
- Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*, 407, 2: 731–748.
- Makela T.H., Wahala K.T., Hase T.A. 2000. Synthesis of enterolactone and enterodiol precursors as potential inhibitors of human estrogen synthetase (aromatase). *Steroids*, 65: 437–441.
- Maurer M., Pronk W., Larsen T.A. 2006. Treatment processes for source-separated urine. *Water Research*, 40, 17: 3151–3166.
- McEwen B.S., Palpinger L., Chaptal C., Gerlach J. Wallach G. 1975. Role of fetal neonatal estrogen binding proteins in the association of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Research*, 96: 400–406.
- Pouwels B., Wille K., Noppe H., De Brabander H., Van de Wiele T., Verstraete W., Boon N. 2008. 17α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, 19, 5: 683–693.
- Römbke J., Knacker T., Stahlschmidt-Allner P. 1996. Studie über Umweltprobleme im Zusammenhang mit Arzneimitteln. Study about environmental problems in context with drugs. F+E Vorhabens Nr. 106 04 121, Berlin. Cit. po Ternes T. A., Kreckel P., Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment*, 225, 1-2 : 91–99.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 3: 241–248.
- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, 32: 1559–1565.
- Schiffer B, Daxenberger A, Meyer K, Meyer H.H.D. 2001. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environmental Health Perspective*, 109: 1145–1151.

- Shackleton C.H.L. 1986. Profiling steroid hormones and urinary steroids. *Journal of Chromatography*, 379: 91–156.
- Shemesh M., Shore L.S. 1994. Effect of hormones in the environment on reproduction in cattle. V: *Factors affecting calf crop*. Fields M.J., Sand R.S. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 287–297.
- Shi W., Wang L., Rousseau D. P. L., Lens P. N. L. 2010. Removal of estrone, 17 α -ethinylestradiol, and 17 β -estradiol in algae and duckweed-based wastewater treatment systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 4: 824–833.
- Sigma-Aldrich. 1998. Guide to solid phase extraction: Bulletin 910. Bellefonte, Sigma-Aldrich: 12 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
(julij, 2010).
- Sigma-Aldrich. 2010. Supelclean LC-Si SPE. St. Louis, Sigma-Aldrich: 1 str.
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=505048|SUPELCO&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US
(julij, 2010).
- Stegić D. 2009. Priprava vzorcev vod za določanje prisotnosti hormonskih motilcev. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 126 str.
- Stuer-Lauridsen F., Kjølholt J., Høiby L., Hinge-Christensen S., Ingerslev F., Hansen M., Krogh K. A., Andersen H. R., Halling-Sørensen B., Hansen N., Køppen B., Bjerregaard P., Frost B. 2005. Survey of estrogenic activity in the Danish aquatic environment. *Environmental Project Nr. 977.*, Copenhagen, Danish Ministry of the Environment: 60 str.
- Sumpter J.P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 103: 173–178.
- Sumpter J.P. 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 33, 1: 9–16.
- Suzuki R., Maruyama T. 2006. Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Research*, 40, 5: 1061–1069.

- Ternes T. A., Kreckel P., Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment*, 225, 1-2 : 91–99.
- Thorpe K., Cummings R., Hutchinson T.H., Scholze M., Brighty G., Sumpter J.P., Tyler C.R. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology*, 37, 6: 1142–1149.
- USEPA. 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: 111 str.
<http://infohouse.p2ric.org/ref/07/06070.pdf> (julij, 2010).
- Voulvoulis N., Scrimshaw M.D. 2003. Methods for the determination of endocrine disrupters. V: *Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes*. Birkett J.W., Lester J.N. (eds.). London, Lewis Publishers: 61–90.
- Walker C.W., Watson J.E. 2010. Adsorption of estrogens on laboratory materials and filters during sample preparation. *Journal of Environmental Quality*, 39: 744–748.
- Waters Corporation. 2000. Oasis SPE, Products & markets, chromatography consumables & columns, sample extraction products, details. Milford, Waters Corporation: 1 str.
http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_us&cid=513209 (julij, 2010).
- Wells M.J.M. 2003. Principles of extraction and the extractions of semivolatile organics from liquids. V: *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Somenath M. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons: 37–131.
- WHO/PCS/EDC/02.2. 2002. International program on chemical safety: Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, World Health Organization: 180 str.
http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (julij, 2010).
- Williams C.L., Stancel G.M. 1996. Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. V: *Estrogens and progestins*, Hardman G., Limbird L. (eds.). New York, McGraw-Hill: 1411–1440.
- Yang W., Cicek N. 2008. Treatment of swine wastewater by submerged membrane bioreactors with consideration of estrogenic activity removal. *Desalination*, 231: 200–208.

- Yi T., Harper W.F. 2007. The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science Technology*, 41: 4311–4316.
- Ying G.G., Kookana R.S., Kumar A. 2008. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1: 87–94.
- Zhao S., Zhang P., Melcer M.E., Molina J.F. 2010. Estrogens in streams associated with concentrated animal feeding operation in upstate New York, USA. *Chemosphere*, 79: 420–425.
- Zuo Y., Zhang K., Deng Y. 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol in Achushnet River Estuary. *Chemosphere*, 63: 1583–1590.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, somentorici doc. dr. Tatjani Tišler in Mirjani Bistan za pomoč, potrpežljivost, vodenje in nasvete pri opravljanju diplomskega dela.

Zahvala gre tudi moji družini za podporo. Posebej bi se zahvalila še sestri Sabini, ki vedno postavi stvari v pravo perspektivo; prijateljici Bredi, ki mi nudi moralno podporo in me spodbuja na poti k boljšemu življenju; ter Heleni, Tanji, Nini in Živi za pasje sprehode, ki so mi velikokrat zbistrili glavo.